

Estudo do desenvolvimento e da produtividade lipídica da levedura *Rhodotorula glutinis*
NCYC 921 em culturas descontínuas monitorizadas por citometria de fluxo.

Raoni Cavalcanti Rodrigues Andrade

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Doutora Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva (LNEG)

Presidente: Professora Doutora Susana Filipe Barreiros (FCT/UNL)

Arguente: Professor Doutor Álvaro Luís Afonso Moreira Rato Fonseca (FCT/UNL)

Monte de Caparica

Novembro de 2010

“Estudo do desenvolvimento e da produtividade lipídica da levedura *Rhodotorula glutinis* NCYC 921 em culturas descontínuas monitorizadas por citometria de fluxo.” © Raoni Andrade – Novembro de 2010.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgá-la através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A Deus pela luz que a mim tem dado.

Aos meus pais Ricardo e Maria pela educação, confiança e esforço para que eu pudessem concluir mais uma fase académica e profissional da minha vida.

Ao meu irmão Rodrigo pelo estímulo.

À Priscila Fernanda, minha namorada, pelo amor, carinho e confiança.

Aos meus familiares que torceram por mim.

Aos meus amigos que ficaram no Brasil torcendo por mim.

Aos amigos brasileiros residentes em Portugal que amenizarem a saudade de casa.

Aos meus professores do mestrado, pelo profissionalismo, ensinamentos e carinho.

À coordenadora Doutora Suzana Barreiros por acolher-me no mestrado em biotecnologia e nos momentos de dúvidas e angústia passar-me tranquilidade e confiança.

Aos meus amigos de mestrado Diana, Margarida, Hélio e Claudia, não só pela presença nos momentos mais difíceis, mas pela amizade verdadeira.

Ao Doutor José Roseiro pelo conhecimento repassado através dos ensinamentos sobre os biorreactores.

À orientadora Doutora Teresa Lopez da Silva pelas explicações, confiança, acessibilidade e por sempre acreditar no projecto.

Ao Doutor Alberto Reis pela orientação, amizade, boleias para a natação e à tranquilidade para resolver todas as situações que se possa imaginar.

À turma do ping-pong do LNEG pela descontração e pela organização do torneio que além de mobilizar e integrar todos me fez repensar a carreira de mesa-tenista.

Aos colegas de laboratório pela convivência e momentos de descontração.

A Portugal, país de gente afável e acolhedora, que me proporcionou dois anos de muito aprendizado e crescimento pessoal.

Sumário

Utilizando-se meios com glucose e glicerol como fontes de carbono em diferentes razões carbono/azoto, foram estudados o desenvolvimento e a capacidade de produção lipídica da *Rhodotorula glutinis* em frascos agitados e em bioreactor de bancada em regime descontínuo monitorizado por citometria de fluxo. Em ensaio em biorreactor com meio formulado para a limitação de azoto onde a fonte de carbono foi a glucose alcançou-se uma concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$) de $4,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (em 16 horas) e uma concentração máxima de lípidos totais ($LT_{\text{máx}}$) de $0,86 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (em 14 horas). Em ensaio em biorreactor com meio formulado para a limitação da fonte de carbono (glucose) alcançou-se uma $X_{\text{máx}}$ de $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (em 13 horas e 45 minutos) e uma $LT_{\text{máx}}$ de $0,74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (em 13 horas e 45 minutos). Realizou-se também um ensaio com aplicação de um pulso de carbono ao fim da fase de desaceleração em que se alcançou uma $X_{\text{máx}}$ de $7,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (em 18 horas e 15 minutos) e uma $LT_{\text{máx}}$ de $1,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (em 16 horas e 15 minutos). A *R. glutinis* mostrou que pode desenvolver-se em meio onde a fonte de carbono é o glicerol. No entanto o seu crescimento foi bastante limitado assim como a sua acumulação em lípidos. Alcançou-se nesse ensaio uma $X_{\text{máx}}$ de $0,54 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (em 10 horas) e uma $LT_{\text{máx}}$ de $0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (em 6 horas).

Palavras chaves: *Rhodotorula glutinis* – Citometria de fluxo – Lípidos – Cultura descontínua

Abstract

Using mediums with glucose and glycerol as carbon sources at different carbon/nitrogen rates it was studied the development and the oil production capability of *Rhodotorula glutinis* in shake flasks and bench bioreactor in a batch mode monitored by flow cytometry. In one assay in bioreactor using a nitrogen limitation formulated medium with glucose like a carbon source was achieved a maximum biomass concentration ($X_{\text{máx}}$) of $4,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (in 16 hours) and a maximum total lipid concentration ($LT_{\text{máx}}$) of $0,86 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (in 14 hours). In another assay in bioreactor using a carbon (glucose) limitation formulated medium was achieved a $X_{\text{máx}}$ of $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (in 13 hours and 45 minutes) and a $LT_{\text{máx}}$ of $0,74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (in 13 hours and 45 minutes). One assay with a carbon pulse application at the end of desacceleration phase was realized wherein was achieved a $X_{\text{máx}}$ of $7,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (in 18 hours and 15 minutes) and a $LT_{\text{máx}}$ of $1,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (in 16 hours and 15 minutes). It was showed that the *R. glutinis* could be developed in a glycerol medium. However, the microorganism growth was very limited as well as its lipid accumulation. In this assay was achieved a $X_{\text{máx}}$ of $0,54 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (in 10 hours) and a $LT_{\text{máx}}$ of $0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (in 6 hours).

Keywords: *Rhodotorula glutinis* – Flow Cytometry – Lipids – Batch culture

Abreviaturas e Símbolos

%	Porcentagem
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
=	Igual
\pm	Mais ou menos
Σ	Somatório
μ	Taxa específica de crescimento
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
A	Área do pico do ácido gordo
Abs	Absorvância
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Autofluorescência
A_T	Soma das áreas corrigidas de todos os ácidos gordos de uma amostra
C	Carbono
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cálcio diidratado
C_f	Concentração de fonte de carbono final
C_i	Concentração de fonte de carbono inicial
CO_2	Dióxido de carbono
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
f	Função
FAMES	<i>Fatty acid methyl esters</i>
FL	Detector de fluorescência do citómetro de fluxo

F_R	Factor de resposta do ácido gordo
FS	<i>Forward Angle Light Scatter</i>
g	Grama
h	Hora
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
IP	Iodeto de propídio
kg	Quilograma
KH_2PO_4	Fosfato monopotássio
L	Litro
ln	Logaritmo natural
LT	Lípidos totais
LT_f	Concentração de lípidos totais final
LT_i	Concentração de lípidos totais inicial
$LT_{máx}$	Concentração máxima de lípidos totais
m	Metro
M	Molaridade
mg	Miligrama
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N	Azoto
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio dibásico

NaOH	Hidróxido de sódio
NCYC	<i>National Collection of Yeast Culture</i>
N _f	Concentração de azoto final
NH ₄ ⁺	Amónio
N _i	Concentração de azoto inicial
nm	Nanómetro
O ₂	Oxigénio
°C	Grau Celsius
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Solução-tampão de fosfato)
pH	Potência de hidrogénio
P _{LT}	Produtividade volumétrica dos lípidos totais
P _{Ltmáx}	Produtividade volumétrica máxima de lípidos totais
psi	Medida de pressão
P _X	Produtividade volumétrica da biomassa
P _{Xmáx}	Produtividade volumétrica máxima da biomassa
<i>R. glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
r _C	Taxa volumétrica de consumo de carbono
r _C	Taxa volumétrica de consumo de fonte de carbono
r _{GLI}	Taxa volumétrica de consumo de glicerol
r _{GLU}	Taxa volumétrica de consumo de glucose
r _{NH4+}	Taxa volumétrica de consumo de amónio amoniacal
Rpm	Rotações por minuto
SCO	<i>Single Cell Oil</i>
SS	<i>Side Scatter</i>

t	Tempo
UV	Ultravioleta
v	Volume
v/v	Proporção em volume
vs	Versus
vvm	Volume de gás por volume de líquido por minuto
X	Biomassa
X_f	Concentração da biomassa final
X_i	Concentração da biomassa inicial
$X_{m\acute{a}x}$	Concentração máxima de biomassa
$Y_{LT/C}$	Rendimento dos lípidos totais em relação à fonte de carbono
$Y_{X/C}$	Rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono
$Y_{X/N}$	Rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto
Δt	Intervalo de tempo
λ	Comprimento de onda

Índice

AGRADECIMENTOS	III
SUMÁRIO.....	IV
ABSTRACT	V
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	VI
ÍNDICE	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
ÍNDICE DE EQUAÇÕES.....	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. BIODIESEL	3
1.2. CAROTENÓIDES	4
1.3. MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DA <i>R. GLUTINIS</i>	5
1.4. CITOMETRIA DE FLUXO	5
2. OBJECTIVOS	8
2.1. OBJECTIVO GERAL	8
2.2. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS	8
3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL ADOPTADA	9
3.1. ESTUDO PRÉVIO DA <i>RHODOTORULA GLUTINIS</i>	9
3.2. ESTUDOS EM BIORREACTOR	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1. MICROORGANISMO E MANUTENÇÃO	10
4.2. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS	10
4.3. PRÉ-INÓCULO	11
4.4. CORRELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE ÓPTICA E O PESO SECO	11
4.5. CORRELAÇÃO ENTRE A FLUORESCÊNCIA E O TEOR DE LÍPIDOS	11
4.5.1. <i>Quantificação do teor de lípidos por citometria de fluxo</i>	12
4.5.2. <i>Dosagem do teor de lípidos pelo método de Bligh e Dyer</i>	12
4.6. CULTURAS	13
4.6.1. <i>Cultura em frascos agitados</i>	13
4.6.2. <i>Culturas em biorreactor</i>	14
4.6.3. <i>Identificação e quantificação dos FAMES por cromatografia gás-líquido</i>	15
4.6.4. <i>Concentração da biomassa</i>	16
4.6.5. <i>Logarítmo natural da concentração da biomassa</i>	16
4.6.6. <i>Concentração da glucose residual</i>	16
4.6.7. <i>Concentração do glicerol residual</i>	16
4.6.8. <i>Concentração de azoto amoniacal residual</i>	17
4.6.9. <i>Dosagem do oxigénio dissolvido no meio de cultura no biorreactor</i>	17
4.6.10. <i>Percentagem de oxigénio consumido</i>	17
4.6.11. <i>Percentagem de dióxido de carbono produzido</i>	17
4.6.12. <i>Percentagem de lípidos totais</i>	17
4.6.13. <i>Concentração de lípidos totais</i>	17
4.6.14. <i>Percentagem de células mortas</i>	17
4.6.15. <i>Taxa específica de crescimento</i>	18

4.6.16.	<i>Taxa volumétrica de consumo da fonte de carbono</i>	18
4.6.17.	<i>Taxa volumétrica de consumo da fonte de azoto</i>	18
4.6.18.	<i>Rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono</i>	19
4.6.19.	<i>Rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto</i>	19
4.6.20.	<i>Rendimento dos lípidos totais em relação à fonte de carbono</i>	19
4.6.21.	<i>Produtividade volumétrica da biomassa</i>	20
4.6.22.	<i>Produtividade volumétrica dos lípidos totais.</i>	20
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1.	ESTUDO PRÉVIO EM FRASCOS AGITADOS	21
5.1.1.	<i>Optimização da aplicação do Vermelho do Nilo</i>	21
5.1.2.	<i>Correlação entre a fluorescência e o teor de lípidos totais</i>	22
5.1.3.	<i>Estudo do crescimento da levedura</i>	23
5.2.	DESENVOLVIMENTO DA <i>R. GLUTINIS</i> EM MEIO COM LIMITAÇÃO DE AZOTO A PH 5,5	26
5.3.	DESENVOLVIMENTO DA <i>R. GLUTINIS</i> EM MEIO COM LIMITAÇÃO DE CARBONO A PH 5,5	28
5.4.	INFLUÊNCIA DO NUTRIENTE LIMITANTE NO DESENVOLVIMENTO DA <i>R. GLUTINIS</i>	30
5.5.	DESENVOLVIMENTO DA <i>R. GLUTINIS</i> EM MEIO COM LIMITAÇÃO DE CARBONO A PH 7	31
5.6.	INFLUÊNCIA DO PH NO DESENVOLVIMENTO DA <i>R. GLUTINIS</i>	33
5.7.	CULTURA DESCONTÍNUA COM PULSO DE CARBONO.....	34
5.8.	DESENVOLVIMENTO EM MEIO CONTENDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO	37
5.9.	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO IP	40
6.	CONCLUSÕES	41
	BIBLIOGRAFIA	42
	ANEXO I - CORRELAÇÃO DENSIDADE ÓPTICA VS PESO SECO DA BIOMASSA	46
	ANEXO II - NORMAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL	47

Índice de figuras

Figura	Título	Página
1	Árvore taxonómica da <i>Rhodotorula glutinis</i> .	1
2	Colónia de <i>Rhodotorula glutinis</i> .	2
3	Estrutura dos carotenóides presentes na <i>R. glutinis</i> .	2
4	Esquema da transesterificação para produção de biodiesel.	3
5	Representação esquemática dum citómetro de fluxo.	6
6	Optimização do uso do Vermelho do Nilo ao corar amostras de <i>R. glutinis</i> .	21
7	Gráfico da correlação entre a fluorescência e o teor de lípidos totais.	22
8	Evolução dos parâmetros medidos ou calculados na cultura em frascos agitados.	23
9	Evolução dos parâmetros medidos ou calculados na cultura descontínua limitada pelo azoto a pH 5,5.	26
10	Evolução dos parâmetros medidos ou calculados na cultura descontínua limitada pelo carbono a pH 5,5.	28
11	Evolução dos parâmetros medidos ou calculados na cultura descontínua limitada pelo carbono a pH 7.	31
12	Evolução dos parâmetros medidos ou calculados na cultura descontínua com pulso de carbono.	34
13	Evolução dos parâmetros medidos ou calculados na cultura descontínua em glicerol.	37
14	Gráfico da correlação entre a densidade óptica a 600 nm e o peso seco da <i>R. glutinis</i> .	46

Índice de tabelas

Tabela	Título	Página
1	Composições dos meios utilizados neste trabalho.	10
2	Culturas realizadas ao longo do trabalho.	13
3	Composição em ácidos gordos, proporção entre saturados e insaturados e percentagem em relação à biomassa das amostras em frascos agitados.	24
4	Parâmetros cinéticos das culturas em biorreactor limitadas pelo carbono e pelo azoto.	30
5	Parâmetros cinéticos das culturas em biorreactor limitadas pelo carbono em pH 5,5 e 7.	33
6	Parâmetros cinéticos das culturas em biorreactor em glicerol e limitada pelo azoto.	39

Índice de equações

Equação	Título	Página
1	Percentagem de ácido gordo.	15
2	Concentração de lípidos totais.	17
3	Taxa volumétrica de consumo da fonte de carbono.	18
4	Taxa volumétrica de consumo da fonte de azoto.	18
5	Rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono.	19
6	Rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto.	19
7	Rendimento dos lípidos totais em relação à fonte de carbono.	19
8	Produtividade volumétrica da biomassa.	20
9	Produtividade volumétrica dos lípidos totais.	20

1. Introdução

O microorganismo da espécie *Rhodotorula glutinis* classifica-se taxonomicamente no reino Fungi, no filo Basidiomycota, na classe Microbotryomycetes, na ordem Sporidiobolales e no género *Rhodotorula*, sendo que sua família ainda não lhe foi atribuída (**Figura 1**).

- ▶ Reino Animalia
- ▶ Reino Archaea
- ▶ Reino Bacteria
- ▶ Reino Chromista
- ▶ Reino Plantae
- ▶ Reino Protozoa
- ▶ Reino Viruses
- ▼ **Reino Fungi**
 - ▶ Filo Ascomycota
 - ▶ Filo Blastocladiomycota
 - ▶ Filo Chytridiomycota
 - ▶ Filo Glomeromycota
 - ▶ Filo Microspora
 - ▶ Filo Neocallimastigomycota
 - ▶ Filo Zygomycota
 - ▼ **Filo Basidiomycota**
 - ▶ Classe Agaricomycetes
 - ▶ Classe Agaricostilbomycetes
 - ▶ Classe Atractiellomycetes
 - ▶ Classe Classiculomycetes
 - ▶ Classe Cryptomycocolacomycetes
 - ▶ Classe Cystobasidiomycetes
 - ▶ Classe Dacrymycetes
 - ▶ Classe Entorrhizomycetes
 - ▶ Classe Exobasidiomycetes
 - ▶ Classe Mixiomycetes
 - ▶ Classe Pucciniomycetes
 - ▶ Classe Tremellomycetes
 - ▶ Classe Ustilaginomycetes
 - ▶ Classe Wallemiomycetes
 - ▼ **Classe Microbotryomycetes**
 - ▶ Ordem Heterogastridiales
 - ▶ Ordem Leucosporidiales
 - ▶ Ordem Microbotryales
 - ▼ **Ordem Sporidiobolales**
 - ▶ Família Sporidiobolaceae
 - ▼ **Família não atribuída**
 - ▶ Género *Ballistosporomyces*
 - ▶ Género *Rhodosporidium*
 - ▶ Género *Sporobolomyces*
 - ▼ **Género *Rhodotorula***
 - Espécie *Rhodotorula acheniorum*
 - Espécie *Rhodotorula aurantiaca*
 - Espécie *Rhodotorula bacarum*
 - Espécie *Rhodotorula fragaria*
 - Espécie *Rhodotorula glutinis***
 - Espécie *Rhodotorula graminis*
 - Espécie *Rhodotorula marina*
 - Espécie *Rhodotorula minuta*
 - Espécie *Rhodotorula mucilaginosa*
 - Espécie *Rhodotorula pustula*
 - Espécie *Rhodotorula rubra*

Figura 1. Árvore taxonómica da *Rhodotorula glutinis*. Adaptado de Catalogue of Life [1]

Esta levedura pode acumular cerca de 60% de lípidos em relação ao seu peso seco [2,3]. Tal característica a torna uma *single cell oil* (SCO), termo atribuído a qualquer microorganismo que acumule mais de 20% de seu peso seco em óleo. Tal organismo possui a seguinte classificação taxonómica:



Figura 2. Colónia de *Rhodotorula glutinis*. Fotografia de colónia crescida em ágar Sabouraud após três semanas a 25°C. Adaptado de Miniatlas Mikroorganismů [4].

As colónias desta levedura são vermelhas alaranjadas (**Figura 2**) devido à presença dos carotenóides: β -caroteno, toruleno e torularrudina (**Figura 3**). Tais carotenóides apresentam-se em fracções milésimas do peso seco e suas concentrações variam a depender das condições de cultivo [5,6,7].

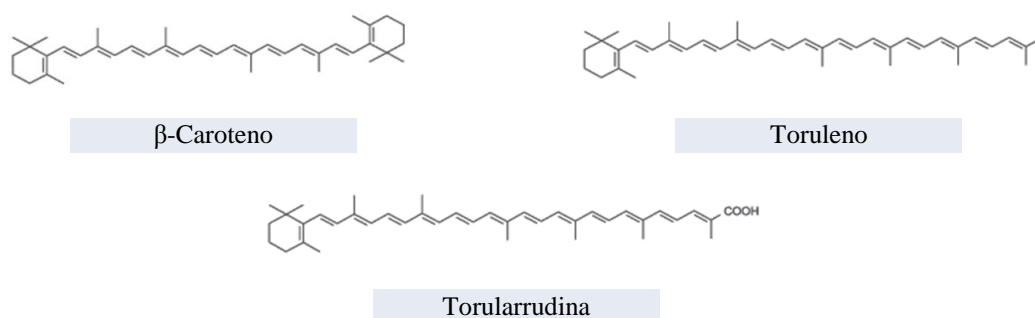


Figura 3. Estrutura dos carotenóides presentes na *R. glutinis*. Adaptado de Squina *et al* [8].

O óleo da *R. glutinis* é composto por lípidos de composição em ácidos gordos dominada principalmente pelos acil gordos: palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoleico (18:2) e γ -linoleico (18:3). A composição em lípidos assim como as suas concentrações em relação ao peso seco variam bastante e dependem das condições de cultivo [9,5,10].

Devido ao facto da *R. glutinis* ser referida como um dos microorganismos promissores para a produção de óleo para obtenção de biodiesel [11] e também possuir os carotenóides

toruleno, torulorrudina e β -caroteno, esta levedura desperta interesse nas indústrias alimentar e farmacéutica e a atenção de grupos de pesquisa que estudam o biodiesel microbiano.

1.1. Biodiesel

O biodiesel consiste em ésteres alquílicos de ácidos gordos provenientes de lípidos animais e vegetais. É um combustível biodegradável, renovável e não tóxico. A sua utilização contribui para a diminuição do dióxido de carbono e do enxofre na atmosfera, pois emite menos poluentes gasosos na sua combustão que os combustíveis líquidos convencionais.

A sua produção industrial consiste no processo de transesterificação dos óleos vegetais (triacilgliceróis) com um álcool de cadeia curta, geralmente metanol (devido ao seu menor custo), do qual resultam ésteres metílicos de ácidos gordos (conhecidos como FAMES, do inglês *fatty acid methyl esters*) e glicerol (**Figura 4**).

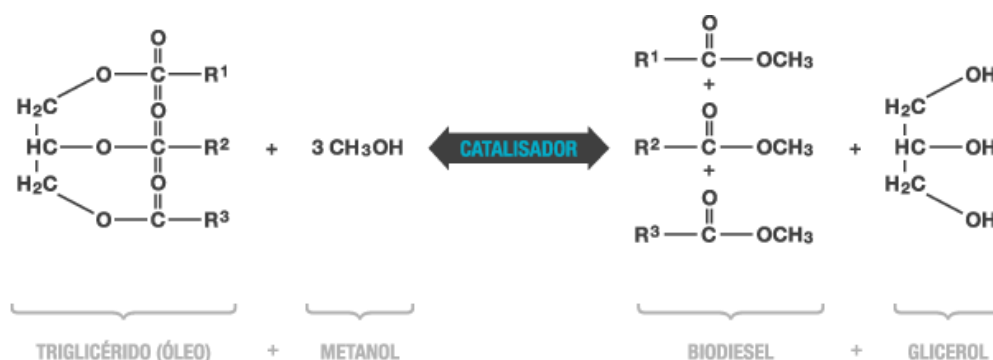


Figura 4. Esquema da transesterificação para produção de biodiesel. Os radicais R¹, R² e R³ representam cadeias longas hidrocarbonadas que constituem os ácidos gordos. Figura adaptada de Ares Lusitani energias do ambiente Lda [12].

A reacção decorre numa sequência de três passos, nos quais os triglicéridos são convertidos em diglicéridos, em seguida os diglicéridos convertidos em monoglicéridos e os monoglicéridos por fim, convertidos em ésteres e glicerol. Os catalisadores utilizados podem ser hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio. Os álcoois que podem ser utilizados são o metanol, etanol, propanol, butanol e ácido amílico, contudo o metanol e o etanol são os mais usados devido ao menor preço em comparação com outros álcoois.

Recentemente a comunidade científica tem olhado com interesse para a utilização de microorganismos para a produção de óleo para biodiesel [11,13]. Alguns microorganismos como microalgas, fungos, leveduras e bactérias podem acumular óleo em grande quantidade [14]. Os óleos microbianos são compostos em sua maioria por triglicéridos que possuem cadeias longas de ácidos gordos (C₁₆ e C₁₈) os quais são semelhantes aos óleos vegetais, tais

como o óleo de soja e de colza. No entanto, a maior parte dos estudos centra-se na utilização de microalgas autotróficas e heterotróficas para produção de biodiesel microbiano.

A vantagem de se utilizar microalgas ao invés dos vegetais reside no facto das microalgas não competirem com a indústria de alimentos, não sofrer com pragas e intempéries climáticas e ocupar um menor espaço que vegetais poderiam ocupar para uma produção comparável de óleo. As desvantagens das microalgas são o alto investimento inicial com fotobiorreactores e a tecnologia que não está totalmente optimizada.

Apesar das microalgas heterotróficas apresentarem taxas específicas de crescimento superiores às autotróficas, algumas leveduras apresentam taxas ainda maiores que às microalgas heterotróficas. Os estudos para a produção de biodiesel microbiano estão avançados, porém, a vertente económica ainda limita a produção em larga escala.

1.2. Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos responsáveis pelas cores amarelo, laranja, vermelho e roxo em algumas plantas e microrganismos. Costumam ser utilizados comercialmente como corantes alimentares naturais e fontes de pigmentação de peixes e mariscos na aquacultura. Recentemente foi descoberto que possuem propriedades anticancerígenas e antioxidantes e por isso espera-se uma maior utilização em fármacos e nutracêuticos [15,16,17]. São considerados produtos de alto valor acrescentado podendo valer centenas de dólares o miligrama.

São produzidos por microrganismos como bactérias, algas, fungos e leveduras. A produção de carotenóides microbianos é altamente eficiente pela facilidade de manipulação dos sistemas de processamento. Actualmente são usadas várias estirpes da levedura *Rhodotorula* na produção industrial de carotenóides. A sua utilização em larga escala apresenta vantagens devido a sua natureza unicelular e elevada taxa de crescimento.

Outra forma de produção de carotenóides é a via sintética, que através de uma sequência de reacções químicas obtem-se o carotenóide em questão a partir de um substrato de estrutura semelhante a do produto final. Uma desvantagem da produção sintética reside no facto de poder acumular resíduos ou impurezas químicas no produto final.

A estrutura de um carotenóide geralmente consiste num esqueleto de 40 átomos de carbono. As propriedades de absorção da luz e, portanto, a sua cor são determinadas principalmente por uma cadeia de ligações duplas carbono-carbono na molécula.

1.3. Meios de cultura utilizados no desenvolvimento da *R. glutinis*

Com o intuito de reduzir os custos das matérias primas que compõe a formulação de meios de cultura para o desenvolvimento da *R. glutinis*, muitos estudos demonstraram que essa levedura desenvolve-se em meios de composições diversas. Como por exemplo, em meios onde a fonte de carbono é a xilose e/ou glucose [2,10] que são os principais componentes da hidrólise de materiais lenhocelulósicos. Também pode-se desenvolver em meios contendo o glicerol como fonte de carbono [10].

Outros trabalhos mostram o desenvolvimento da *R. glutinis* em substratos de origem agro-industrial como o soro e o ultrafiltrado do soro do leite [6], mosto de uvas concentrado rectificado [18], em melaço de beterraba [19,20], extracto de farinha de soja [7], mosto de uva [7], xarope de glucose [7], extracto de farinha de trigo [7], melaço de cana de açúcar [9] e xarope de milho [21].

Um aspecto importante na formulação do meio de cultura para a *R. glutinis* é a razão carbono/azoto (C/N). Estudos têm apresentado uma relação entre a produtividade lipídica e a razão C/N presente inicialmente no meio de cultura [22]. À medida que aumenta a razão C/N aumenta a acumulação de lípidos em leveduras. No entanto, essa relação tem um limite, pois, elevadas concentrações de glucose induzem à limitação pelo substrato.

Assim, ao esgotar-se o azoto presente no meio, as células existentes deixam de se multiplicar, visto que o azoto é essencial para a síntese de ADN e o carbono continuará a ser assimilado para a conversão de reservas lipídicas como os triglicéridos [23]. Wynn *et al* [24] descreveu uma estratégia de indução da síntese de lípidos, na qual células da microalga *Cryptothidium cohnii* foram desenvolvidas em meio limitado por glucose, seguindo-se um período de limitação de azoto (elevada razão molar C/N) durante o qual as células desta microalga metabolizaram o excesso de carbono em lípidos de reserva.

1.4. Citometria de fluxo

Um citómetro de fluxo é um sistema constituído por cinco elementos: fontes de radiação (lâmpada de mercúrio ou laser), câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para selecção de intervalo de comprimento de onda específico a partir de uma gama espectral mais vasta, fotodíodos ou fotomultiplicadores para detecção sensível e processamento dos sinais com interesse em uma unidade que processa os dados recolhidos.

A amostra que vai ser observada em citometria de fluxo é constituída por uma suspensão de células ou de partículas as quais, incluídas na corrente em fluxo laminar com uma solução salina, são forçadas a passar uma a uma através da câmara de fluxo. Esta câmara é atra-

vessada por um feixe de raios laser com comprimento de onda pré-estabelecido. Sempre que o raio laser intersecta uma célula, a radiação vai sofrer desvio que depois de convertidos pelo citómetro em sinais electrónicos vão ser reconhecidos pelos sensores.

Um dos sensores é designado por *Forward Angle Light Scatter* (FS), porque se encontra colocado no sentido da direcção do feixe luminoso. Outro situa-se sensivelmente a 90 graus dessa direcção, designando-se *Ortogonal ou Side Scatter* (SS). Simplificadamente poderá dizer-se que o sensor FS dá informação sobre o tamanho da célula, baseado na difracção e refracção da luz, enquanto o sensor SS que mede a luz dispersada, avalia a granulosidade intracelular, constituída pelo núcleo, cromossomas e outros organelos ou partículas [25].

O sistema óptico resume-se a unidades de filtros ópticos que fazem a selecção de um intervalo de comprimento de onda específico a partir de uma gama espectral mais vasta. O dispositivo de recolha é formado por diversos espelhos dicróicos e filtros que absorvem a uns comprimentos de onda e transmitem a outros (FL1, FL2 e etc) (**Figura 5**). O intervalo de comprimento de onda transmitido é encaminhado em direcção aos detectores, que são constituídos por fotomultiplicadores ou fotodíodos que medem a amplitude de luz dispersa ou a fluorescência. A citometria de fluxo pode medir vários parâmetros de fluorescência, dependendo do número de lasers e detectores disponíveis [26].

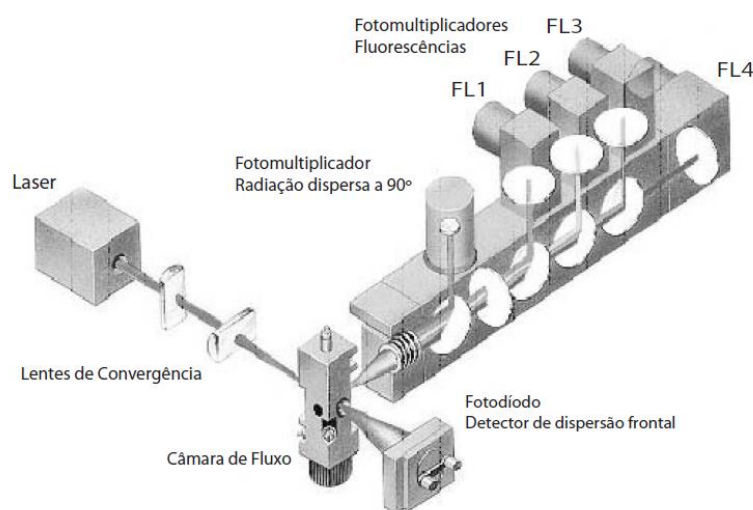


Figura 5. Representação esquemática dum citómetro de fluxo. Adaptado de da Silva *et al* [27].

O sistema electrónico converte os sinais ópticos em sinais electrónicos e são digitalizados para uma avaliação final, obtendo-se dados altamente correlacionados. Com as informações provenientes dos variados sensores a parte informática do citómetro, de acordo com as características das próprias células agrupa-as em histogramas virtuais [28].

Estudos tem demonstrado que é possível estimar em tempo real o teor em lípidos de células de leveduras através da citometria de fluxo utilizando o corante Vermelho do Nilo (9-dietilamina-5H-benzo-[a]fenoxazina-5-ona) [29]. O Vermelho do Nilo é um composto lipofílico que ao associar-se aos lípidos celulares emite fluorescência nas cores vermelho e amarelo-ouro após excitação a 488 nm.

A fluorescência de cor vermelha é proveniente da associação do Vermelho do Nilo aos lípidos polares (mais presentes nas membranas citoplasmáticas). A fluorescência de cor amarelo-ouro é proveniente da associação do Vermelho do Nilo aos lípidos neutros (mais presentes nas reservas intracelulares). A soma dessas duas fluorescências equivale ao teor de lípidos totais de uma célula [30].

A determinação do teor de lípidos através da citometria é de grande valia visto que a monitorização do crescimento de uma levedura pode ser feita em directo possibilitando assim a mudança da estratégia de controlo do processo (por exemplo, a mudança da razão molar C/N) o que não seria possível com as análises tradicionais gravimétricas para a quantificação do teor de lípidos. Estas últimas consomem demasiado tempo com a extracção dos lípidos de uma grande quantidade de amostra (para se diminuir o erro associado) utilizando em geral solventes orgânicos, seguido de evaporação de solventes e a determinação da quantidade de lípidos pesando-se o extracto seco.

Outra vantagem da citometria de fluxo é que para se efectuar as análises somente 1 mL de amostra é necessário. Este facto somado ao alto grau processamento de amostras efectuado pelo citómetro (12 amostras por hora) possibilita a realização de novas pesquisas como a monitorização de culturas para produção em larga escala, pesquisar novas espécies de microorganismos oleaginosos, ecotoxicidade etc [31].

Também, podem-se analisar a viabilidade celular através do corante iodeto de propínio (IP). Este corante liga-se ao ADN e emite fluorescência de cor vermelha após excitar-se a 488 nm. No entanto, só consegue fazê-lo se a membrana celular estiver despolarizada e, portanto, permeabilizada. O IP associado à citometria de fluxo revela em uma população celular a percentagem de células mortas [27].

2. Objectivos

2.1. Objectivo geral

- Caracterizar o desenvolvimento e a capacidade de produção lipídica da *Rhodotorula glutinis* NCYC 921 em frascos agitados e em biorreactor de bancada em regime descontinuo, monitorizado por citometria de fluxo, utilizando meios formulados para a limitação de azoto e de carbono (glucose e glicerol como fonte de carbono).

2.2. Objectivos específicos

- Estabelecer uma correlação entre a fluorescência emitida pelas células de *R. glutinis* coradas com Vermelho do Nilo, detectada por citometria de fluxo, e o teor de óleo extraído da biomassa, quantificado gravimetricamente pelo método tradicional de Bligh e Dyer, com o objectivo de permitir a análise em tempo real do teor de óleo das células de levedura, durante as fermentações realizadas.

- Induzir dois tipos de condições nutricionais sequenciais, de forma a permitir o crescimento celular (excesso de carbono) seguido de limitação de azoto com excesso de carbono (elevada razão carbono/azoto), para que o crescimento pare e o carbono seja assimilado pela levedura para a produção de lípidos.

- Comparar o desenvolvimento e a capacidade de produção lipídica da *R. glutinis* em culturas descontínuas em biorreactor com meio formulado para a limitação pelo carbono à pH 5,5 e 7 constantes.

3. Estratégia experimental adoptada

3.1. Estudo prévio da *Rhodotorula glutinis*

Nesta etapa inicial a *R. glutinis* foi cultivada em frascos agitados para estudar-se o seu crescimento e produtividade lipídica. Também nesta etapa foi otimizada a aplicação do fluorocromo Vermelho do Nilo às amostras de *R. glutinis* no que diz respeito à quantidade e ao tempo de incubação utilizados.

Foi estabelecida a correlação entre a densidade óptica e o peso seco e a correlação entre a fluorescência do Vermelho do Nilo, detectada por citómetro de fluxo, emitida pelas células coradas com este, e o teor de lípidos totais determinados gravimetricamente pelo método de Bligh e Dyer.

Tais correlações foram utilizadas em todos os ensaios realizados (crescimento em frascos agitados e biorreactor) para a obtenção de parâmetros diversos como concentrações e produtividades volumétricas de biomassa e lípidos.

3.2. Estudos em biorreactor

Nesta segunda etapa foram realizadas culturas descontínuas em biorreactor com o objectivo de caracterizar o crescimento e a produtividade lipídica da *R. glutinis* em diferentes condições. Realizaram-se as culturas: 1) com meio formulado para limitação de carbono a pH 5,5; 2) com meio formulado para limitação de carbono a pH 7; 3) com meio formulado para limitação de azoto; 4) com glicerol como fonte única de carbono; 5) com meio formulado para a limitação de carbono com aplicação de pulso de carbono ao final da fase de desaceleração, de forma a induzir subsequentes limitações nutricionais (carbono e azoto).

Ao final desses ensaios pôde-se, por comparação, analisar a influência do pH (5,5 e 7), do nutriente limitante (carbono ou azoto) e do tipo de fonte de carbono no crescimento e na produtividade lipídica da *R. glutinis*.

4. Materiais e métodos

4.1. Microorganismo e manutenção

A levedura *Rhodotorula glutinis* NCYC 921 foi adquirida junto à *National Collection of Yeast Culture* e mantida em rampas de *Yeast Medium Agar* (DIFCO LABORATORIES, Estados Unidos) incubadas em estufa (MEMMERT, Alemanha) a 30°C, durante três dias e depois estocadas a 4°C.

4.2. Composição dos meios

Os meios utilizados no trabalho (**Tabela 1**) basearam-se no meio utilizado por Yoon e Rhee [3] para a limitação de azoto (**Tabela 1; I**), que foi o mesmo meio utilizado no ensaio prévio em frascos agitados. Este meio sofreu uma alteração na sua formulação, nomeadamente a diminuição da concentração de glucose de 35 g·L⁻¹ para 10 g·L⁻¹, para que se tornasse um meio limitante da fonte de carbono (glucose). Esse novo meio (**Tabela 1; II**) foi usado no pré-inóculo, com o propósito das células se desenvolverem sem ter glucose em excesso ao final, e também nos ensaios onde a fonte de carbono (glucose) foi o nutriente limitante.

Tabela 1. Composições dos meios utilizados neste trabalho. Valores em g·L⁻¹.

Meio	CaCl ₂ ·2H ₂ O	MgSO ₄	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	extrato de levedura	(NH ₄) ₂ SO ₄	Glucose	Glicerol
I - Yoon e Rhee	0,134	0,73	2	7	0,5	1	35	-
II - Limitação de carbono	0,134	0,73	2	7	0,5	1	10	-
III - Limitação de azoto	0,134	0,73	2	7	0,125	-	10	-
IV - Glicerol	0,134	0,73	2	7	0,125	-	-	10,4

O meio formulado para a limitação de azoto (**Tabela 1; III**) diferencia-se do meio para limitação de carbono pela ausência de sulfato de amónio e pela diminuição em quatro vezes da concentração do extrato de levedura. O meio formulado para crescimento em glicerol (**Tabela 1; IV**) é semelhante ao meio para limitação de azoto com a diferença da substituição da glucose pelo glicerol.

Os reagentes utilizados para compor os diversos meios foram: CaCl₂·2H₂O (MERCK, Alemanha); MgSO₄ (MERCK, Alemanha); Na₂HPO₄ (PANREAC, Espanha); KH₂PO₄ (PANREAC, Espanha); extrato de levedura (BD, Inglaterra); (NH₄)₂SO₄ (PANREAC, Espanha); glucose (V.P., Portugal); glicerol (SIGMA, Estados Unidos). Nos ensaios em biorreator adicionou-se aos meios 100 µL de antiespuma propilenoglicol (VWR, França).

4.3. Pré-inóculo

O pré-inóculo foi constituído por células retiradas de duas rampas de *R. glutinis* (item 4.1) e transferidas para 300 mL de meio II (Tabela 1) contidas num frasco de 1 L com anteparas incubado a 30°C a 120 rpm em um agitador-incubadora (UNITRON INFORS, Suíça), durante 3 dias.

4.4. Correlação entre a densidade óptica e o peso seco

A levedura *R. glutinis* desenvolveu-se em frascos agitados de 1 L com anteparas contendo 300 mL de meio III (Tabela 1) durante três dias em 120 rpm de agitação, a 30°C. Em seguida efectuaram-se diluições sucessivas de forma a obterem-se amostras com absorvância entre 0,3 e 3, lidas ao comprimento de onda de 600 nm em espectrofotómetro (Thermo Spectronic genesis 20, THERMO SCIENTIFIC, Estados Unidos).

Logo após a leitura em espectrofotómetro, filtraram-se 5 mL de cada amostra diluída em filtros de 0,2 µm (Membranfilter porafil, MACHEREY-NAGEL, Alemanha). Em seguida os filtros foram submetidos a ciclos de 1 hora em estufa a 60°C e 1 hora em exsiccador até peso constante. Assim, sabendo-se previamente o peso de cada filtro antes da filtração e o peso seco do meio livre de células pôde-se relacionar a densidade óptica com o peso seco da biomassa. As amostragens foram feitas em duplicado.

4.5. Correlação entre a fluorescência e o teor de lípidos

Realizou-se um crescimento da levedura em frascos agitados, de forma a obter amostras de *R. glutinis* em diferentes fases do desenvolvimento, com diferentes teores de lípidos. Tal crescimento foi realizado em triplicado, em frascos de 1 L com anteparas contendo 190 mL de meio II (Tabela 1) mais 10 mL de inóculo desenvolvido. As culturas foram incubadas a 30°C, a 120 rpm, durante 4 dias.

As amostras foram colhidas ao longo do desenvolvimento das culturas, e foram analisadas por citometria de fluxo e densidade óptica. O conteúdo de três frascos foi centrifugado a 10000 rpm (Avanti Centrifuge J-25 I, BECKMAN, Estados Unidos) e o sobrenadante armazenado a -18°C para posterior análise da glucose e do azoto residuais. A biomassa centrifugada também foi armazenada a -18°C para posterior análise dos lípidos totais pelo método de Bligh e Dyer [32].

4.5.1. Quantificação do teor de lípidos por citometria de fluxo

O teor de lípidos totais foi quantificado utilizando-se um citómetro de fluxo *FACScan* (BD INSTRUMENTS, Bélgica) equipado com laser de argón de 488 nm. A análise citométrica em associação ao Vermelho do Nilo (RIEDEL DE HAËN, Alemanha) foi efectuada de acordo com um protocolo descrito por de La Jara *et al* [31] no qual foram adicionados 20 µL de corante para 1 mL de amostra seguido de agitação em vortex (MS2 Minishaker, IKA, Estados Unidos) e incubação durante 30 segundos a 37°C.

A concentração de cada amostra foi ajustada por diluições com tampão PBS (OXOID, Inglaterra) de forma a que o número de eventos por segundo fosse cerca de 800 a 1000. Os valores da fluorescência correspondente ao teor de lípidos polares foram obtidos da mesma forma que em da Silva *et al* [33], pela razão entre a fluorescência detectada pelo canal FL3 da amostra corada pela fluorescência detectada pelo mesmo canal da amostra não corada (auto-fluorescência das células em FL3) (FL3/AF3).

O mesmo foi efectuado para a obtenção dos valores da fluorescência correspondente ao teor de lípidos neutros com a razão entre a fluorescência obtida pelo canal FL2 com a amostra corada e a obtida por este canal com a amostra não corada (FL2/AF2). A fluorescência correspondente ao teor de lípidos totais é obtida pela soma dos valores das fluorescências para lípidos polares e neutros.

4.5.2. Dosagem do teor de lípidos pelo método de Bligh e Dyer

Para a determinação gravimétrica do teor de lípidos pelo método de Bligh e Dyer [32] a biomassa foi previamente liofilizada e depois moída em moinho de discos (N.V. TEMA, Bélgica). Desse material moído, cerca de 100 mg foi submetido a uma primeira extracção com 95 mL de mistura monofásica metanol (V.P., Portugal), clorofómio (RIEDEL DE HAËN, Alemanha) e água destilada (10:5:4 v/v/v) durante a noite em placa de agitação (IKAMAG RET, IKA, Estados Unidos) com barra magnética e temperatura ambiente.

A suspensão foi depois centrifugada a 1000 rpm (Precision universal centrifuge, WAFERETECH GCA, Estados Unidos) durante 30 minutos, o sobrenadante recolhido em ampola de decantação e o material residual submetido a mais duas extracções com 19 mL de mistura monofásica durante 1 hora em placa de agitação com barra magnética, seguido de centrifugação a 1000 rpm, durante 30 minutos. Os sobrenadantes dessas duas centrifugações foram reunidos ao da primeira extracção na ampola de decantação e a razão dos componentes da mistu-

ra na ampola corrigida para 10:10:9 v/v/v. A mistura corrigida foi agitada e deixada durante a noite a separar as fases.

A fase inferior contendo os lípidos totais foi recolhida em balão de pesagem, passando previamente por filtro (W52, WHATMAN, Inglaterra) contendo sulfato de sódio anidro (MERCK, Alemanha) para remoção de qualquer vestígio de água. A fase superior, mais polar, contendo restos de células, material protéico e glucídico, foi desprezada. O solvente foi removido dos lípidos totais através de rotavapor (R-200, BUCH, Suíça).

Os balões de pesagem foram então levados à estufa a 100°C por 18 horas. Após estufa os mesmos balões foram levados ao exsiccador por períodos de 1,5 horas até temperatura constante e em seguida obteve-se a quantificação dos lípidos totais por diferença do peso dos balões contendo os lípidos totais após a extração e do peso dos balões vazios antes da extração.

4.6. Culturas

As seis culturas realizadas durante o trabalho estão apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Culturas realizadas ao longo do trabalho.

Cultura	Meio	pH	Fonte de carbono	Pulso	Limitação
Frascos agitados	I	5,5 (inicial)	Glucose	-	C
Biorreactor	II	5,5	Glucose	-	C
Biorreactor	II	7	Glucose	-	C
Biorreactor	II	5,5	Glucose	Glucose	C seguido de N
Biorreactor	III	5,5	Glucose	-	N
Biorreactor	IV	5,5	Glicerol	-	-

4.6.1. Cultura em frascos agitados

A *R. glutinis* desenvolveu-se em frascos agitados de 1 L com anteparas contendo 190 mL de meio I (**Tabela 1**) mais 10 mL de inóculo (**item 4.3**) durante quatro dias em 120 rpm de agitação à 30°C. As amostragens foram realizadas durante os quatro dias em triplicado. Em cada amostragem realizou-se a leitura da absorvância e da citometria de fluxo para determinação do teor de lípidos totais (**item 4.6.12**) e do cálculo do logaritmo da concentração da biomassa (**item 4.6.5**).

Por fim, a cultura dos três erlenmeyers (de cada amostra) foi centrifugada a 10000 rpm (Avanti Centrifuge J-25 I, BECKMAN, Estados Unidos) durante 20 minutos para obtenção da biomassa e do sobrenadante, sendo estes armazenadas a -18°C para posterior análise dos ácidos gordos (**item 4.6.3**) e quantificação de glucose e azoto residuais respectivamente (**itens 4.6.6 e 4.6.8**).

Foram determinados parâmetros cinéticos para a caracterização do crescimento da *R. glutinis* em frascos agitados como a taxa específica de crescimento (μ) (**item 4.6.15**), a taxa volumétrica de consumo de glucose (r_{GLU}) (**item 4.6.16**) e a taxa volumétrica de consumo de azoto ($r_{NH_4^+}$) (**item 4.6.17**), o rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono ($Y_{X/C}$) (**item 4.6.18**), o rendimento da biomassa em relação ao azoto ($Y_{X/N}$) (**item 4.6.19**), o rendimento dos lípidos totais em relação à fonte de carbono ($Y_{LT/C}$) (**item 4.6.20**), a máxima produtividade volumétrica da biomassa alcançada ($P_{Xmáx}$) (**item 4.6.21**), a máxima produtividade volumétrica dos lípidos totais alcançada ($P_{LTmáx}$) (**item 4.6.22**) e por observação gráfica (**itens 4.6.4 e 4.6.13**) determinou-se a máxima concentração de biomassa alcançada ($X_{máx}$) e a máxima concentração de lípidos totais alcançada ($LT_{máx}$).

4.6.2. Culturas em biorreactor

Os ensaios foram realizados em bioreactor BIOFLO III batch/continuous fermentor (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Estados Unidos) utilizando 2 L de volume onde 200 ml provinham do inóculo desenvolvido e 1,8 L de meio utilizado em cada ensaio (**Tabela 1**). As culturas foram desenvolvidas a 150 rpm de agitação das turbinas, 1vvm de aeração, 30°C de temperatura e pH ajustado com HCl (2 M) (PANREAC, Espanha) e NaOH (2 M) (V.P., Portugal). Em todas as culturas o pH foi ajustado a 5,5 excepto na cultura descontínua limitada pelo carbono em pH 7. Em todos os ensaios adicionou-se 100 μ l de propilenoglicol para se evitar a formação de espuma.

Cada amostragem consistia na leitura do oxigénio dissolvido no meio de cultura (**item 4.6.9**), na leitura da entrada e saída dos gases do biorreactor para a determinação das percentagens de oxigénio consumido e dióxido de carbono produzido (**itens 4.6.9 e 4.6.11**), na leitura da absorvância, em triplicado, para obtenção da concentração da biomassa (**item 4.6.4**) e do logaritmo da concentração da biomassa (**item 4.6.5**). Em paralelo efectuou-se a determinação do teor de lípidos por citometria de fluxo (**item 4.6.12**) para a determinação da percentagem e concentração de lípidos totais (**itens 4.6.12 e 4.6.13**).

Por fim, a amostra foi filtrada em filtros de 0,2 μ m (Membranfilter porafil, MACHEREY-NAGEL, Alemanha) para obtenção do filtrado que era armazenado a -18°C para futura quantificação da fonte de carbono (**itens 4.6.6 ou 4.6.7**) e azoto (**item 4.6.8**) residuais. Determinaram-se parâmetros cinéticos para a caracterização do crescimento da *R. glutinis* em biorreactor como o μ (**item 4.6.15**), r_{GLU} ou r_{GLI} (**item 4.6.16**) e $r_{NH_4^+}$ (**item 4.6.17**), $Y_{X/C}$ (**item**

4.6.18), $Y_{X/N}$ (item 4.6.19), $Y_{LT/C}$ (item 4.6.20), $P_{X_{m\acute{a}x}}$ (item 4.6.21), $P_{LT_{m\acute{a}x}}$ (item 4.6.22) e por observação gráfica (itens 4.6.4 e 4.6.13) determinaram-se a $X_{m\acute{a}x}$ e a $LT_{m\acute{a}x}$.

4.6.3. Identificação e quantificação dos FAMES por cromatografia gás-líquido

A preparação dos FAMES foi efectuada segundo Lepage e Roy [34] com algumas modificações. Pesou-se cerca de 100 mg de biomassa liofilizada para tubos de ensaio com rosca contendo azoto, nos quais adicionou-se 5 mL de mistura metanol e cloreto de acetilo (19:1 v/v). A reacção ocorreu em banho-maria (Water Bath 1086, GFL, Alemanha), durante uma hora a 80°C. Após arrefecimento adicionou-se 1 mL de água destilada e 2 mL de *n*-hexano (MERCK, Alemanha) a cada tubo. A camada superior, contendo *n*-hexano e os ésteres metílicos, foi filtrada em pipetas de Pasteur contendo uma camada de sulfato de sódio anidro (MERCK, Alemanha) e uma camada de algodão e armazenada em vials a -18°C. Cada amostra foi derivatizada em duplicado.

A análise dos FAMES foi realizada utilizando-se um cromatógrafo em fase gasosa (3800 Gas Chromatograph, VARIAN, Estados Unidos), equipado com um detector de ionização de chama. A separação foi efectuada numa coluna capilar de sílica fundida (Supelcowax 10, SUPELCO, Estados Unidos) de 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,32 µm de espessura do filme, utilizando hélio como gás de arraste a um caudal de 3,5 mL·min⁻¹.

A temperatura da coluna foi programada para um ciclo de 200°C durante 8 minutos, seguido de aumento a uma taxa de 4°C por minuto até 240°C, onde se manteve durante 16 minutos. As temperaturas do injector e detector foram 250 e 280°C respectivamente e a razão de split foi de 1:50 durante 5 minutos, e em seguida 1:10 durante o tempo restante. A pressão da coluna foi 13,5 psi.

A identificação dos picos e o cálculo do factor de resposta foram realizados utilizando padrões conhecidos (NU-CHECK-PREP, Estados Unidos). Cada amostra foi efectuada em duplicado, e cada duplicado foi injectado duas vezes. A quantificação dos ácidos gordos foi efectuada em termos de percentagem de áreas, de acordo com a equação:

$$\% \text{ ácido gordo} = \frac{A \times F_R}{A_T} \times 100$$

Equação 1. Percentagem de ácido gordo. Onde: A = área do pico do ácido gordo em questão; F_R = factor de resposta do ácido gordo em questão; $A \times F_R$ = área corrigida do pico em questão; A_T = soma das áreas corrigidas de todos os ácidos gordos de uma amostra.

4.6.4. Concentração da biomassa

Para a determinação da concentração da biomassa foi feita a leitura da absorvância da amostra em espectrofotómetro Thermo Spectronic genesis 20 (THERMO SCIENTIFIC, Estados Unidos) a 600 nm e com o valor obteve-se a concentração da biomassa através da correlação entre a absorvância e o peso seco da biomassa (item 4.4). A correlação está apresentada no Anexo I – Correlação densidade óptica vs peso seco da biomassa.

4.6.5. Logarítmo natural da concentração da biomassa

Calculou-se o logarítmo natural dos valores obtidos no **item 4.6.4.**

4.6.6. Concentração da glucose residual

Utilizando os filtrados das amostras a dosagem da concentração de glucose residual foi obtida pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) proposto por Miller [35]. Foram preparadas soluções padrão de glucose (V.P., Portugal) em água destilada na gama de 0,5 a 3 g·L⁻¹ para a realização da curva de calibração. A partir de 0,5 mL de amostra (filtrado), padrão ou branco (água destilada) foram adicionados 3 mL de reagente DNS. Algumas amostras foram diluídas previamente com água destilada para que a leitura da absorvância estivesse dentro da gama de absorvância dos padrões.

As soluções em tubos de ensaio foram mergulhadas em banho de água em ebulição por cinco minutos e depois arrefecidas em banho de água fria. A seguir foram adicionados 16 mL de água destilada e a solução homogenizada em vortex (MS2 Minishaker, IKA, Estados Unidos).

A medição da absorvância foi efectuada a 550 nm, a temperatura ambiente, tendo-se utilizado células de plástico com 1 cm de percurso óptico. Cada amostra foi analisada em triplicado. Traçou-se então a curva de calibração ($Abs = f(C)$) com os padrões utilizados e calcularam-se os valores de concentração de glucose para cada uma das amostras.

4.6.7. Concentração do glicerol residual

Utilizando os filtrados das amostras realizou-se a dosagem da concentração do glicerol residual por cromatografo gasoso Waters LC1 module 1 plus (MILLFORD, Estados Unidos) equipado com detector de index refratário. A coluna utilizada foi a Aminex HPX-87H (BIO-RAD LABORATORIES, Estados Unidos) operando a 50°C com 0,005 M de H₂SO₄ utilizado como fase móvel a um caudal de 0,4 mL·min⁻¹.

4.6.8. Concentração de azoto amoniacal residual

Utilizando-se os filtrados das amostras realizou-se a quantificação de azoto residual através do kit Spectroquant Ammonium Cell Test (MERCK, Alemanha).

4.6.9. Dosagem do oxigénio dissolvido no meio de cultura no biorreactor

O oxigénio dissolvido no meio de cultura foi detectado através de uma sonda In-Pro6100 (METTLER-TOLEDO, Suíça) esterelizável e adaptável ao biorreactor. Os resultados foram fornecidos directamente ao biorreactor em forma de percentagem de oxigénio dissolvido no meio de cultura.

4.6.10. Percentagem de oxigénio consumido

Calculou-se a percentagem de oxigénio consumido pela diferença entre a percentagem de oxigénio no ar de entrada e no ar de saída do biorreactor para cada amostragem.

4.6.11. Percentagem de dióxido de carbono produzido

Calculou-se a percentagem de dióxido de carbono produzido pela diferença entre a percentagem de dióxido de carbono no ar de saída e no ar de entrada do biorreactor para cada amostragem.

4.6.12. Percentagem de lípidos totais

Interpolando os resultados da medição da fluorescência do Vermelho do Nilo obtida por citómetro de fluxo na correlação do **item 4.5**, obteve-se a percentagem de lípidos totais para cada amostra.

4.6.13. Concentração de lípidos totais

Sabendo-se a concentração de biomassa (**item 4.6.4**) e a percentagem de lípidos totais (**item 4.6.12**) da amostra analisada calculou-se a concentração de lípidos totais pela equação:

$$LT = X \times LT\%$$

Equação 2. Concentração de lípidos totais. Onde: LT = concentração de lípidos totais ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); X = concentração de biomassa ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); LT% = teor de lípidos totais ($\text{g}_{\text{lípidos}} \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$).

4.6.14. Percentagem de células mortas

A percentagem de células mortas foi obtida através da fluorescência, detectada por citometria de fluxo, emitida pelas células coradas com Iodeto de Propídio (IP) (INVITROGEN,

Estados Unidos). A solução-mãe de IP foi preparada com $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em água destilada. A concentração de IP foi $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. O IP foi excitado a 488 nm e a fluorescência das células coradas foi medida a 585 nm (FL2). A concentração de cada amostra foi ajustada para cerca de 800 a 1000 eventos por segundo através de diluições da amostra com PBS (OXOID, Inglaterra).

4.6.15. Taxa específica de crescimento

As taxas específicas de crescimento (μ) de cada ensaio foram calculadas através do gráfico $\ln X$ pelo tempo (**item 4.6.5**), seleccionando os pontos relativos à fase exponencial da levedura e calculando a correspondente correlação linear. A taxa específica de crescimento é o declive da correlação.

4.6.16. Taxa volumétrica de consumo da fonte de carbono

No caso da fonte de carbono (**itens 4.6.6 ou 4.6.7**) esgotar-se antes do término do ensaio a taxa de consumo da fonte de carbono é calculada considerando-se o tempo decorrido até o momento do esgotamento. No caso de não esgotar, considera-se para o cálculo o tempo total do ensaio. A taxa volumétrica de consumo da fonte de carbono foi calculada através da seguinte função:

$$r_C = \frac{C_i - C_f}{\Delta t}$$

Equação 3. Taxa volumétrica de consumo da fonte de carbono. Onde: r_C = taxa volumétrica de consumo da fonte de carbono ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), que pode ser r_{GLU} (quando a fonte de carbono for a glucose) ou r_{GLI} (quando a fonte de carbono for o glicerol); C_i = concentração inicial da fonte de carbono no tempo inicial ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); C_f = concentração final da fonte de carbono no tempo t ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); Δt = intervalo de tempo decorrido (h).

4.6.17. Taxa volumétrica de consumo da fonte de azoto

No caso da fonte de azoto (**item 4.6.8**) esgotar antes do término do ensaio a taxa volumétrica de consumo da fonte de azoto é calculada considerando o tempo decorrido até o momento do esgotamento. No caso de não esgotar, considera-se para o cálculo o tempo total do ensaio. A taxa volumétrica de consumo da fonte de azoto foi calculada através da função:

$$r_{\text{NH}_4^+} = \frac{N_i - N_f}{\Delta t}$$

Equação 4. Taxa volumétrica de consumo da fonte de azoto. Onde: $r_{\text{NH}_4^+}$ = taxa volumétrica de consumo da fonte de azoto ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); N_i = concentração inicial da fonte de azoto no tempo inicial ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); N_f = concentração final da fonte de azoto no tempo t ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); Δt = intervalo de tempo decorrido (h).

4.6.18. Rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono

Sabendo-se as concentrações da fonte de carbono (**itens 4.6.6 ou 4.6.7**) inicial e final (ao final do ensaio ou ao esgotar-se) e a concentração de biomassa (**item 4.6.4**) formada no mesmo período calculou-se o rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono pela seguinte equação:

$$Y_{X/C} = \frac{X_f - X_i}{C_i - C_f}$$

Equação 5. Rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono. Onde: $Y_{X/C}$ = rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono ($g_{\text{biomassa}} \cdot g_{\text{subs. consumido}}^{-1}$); X_f = concentração da biomassa correspondente à da fonte de carbono final ($g \cdot L^{-1}$); X_i = concentração da biomassa inicial ($g \cdot L^{-1}$); C_i = concentração da fonte de carbono inicial ($g \cdot L^{-1}$); C_f = concentração da fonte de carbono final ($g \cdot L^{-1}$).

4.6.19. Rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto

Sabendo-se as concentrações da fonte de azoto (**item 4.6.8**) inicial e final (no final do ensaio ou ao esgotar-se) e a concentração da biomassa (**item 4.6.4**) formada no mesmo período chega-se ao rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto pela equação:

$$Y_{X/N} = \frac{X_f - X_i}{N_i - N_f}$$

Equação 6. Rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto. Onde: $Y_{X/N}$ = rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto ($g_{\text{biomassa}} \cdot g_{\text{substrato consumido}}^{-1}$); X_f = concentração da biomassa correspondente à da fonte de azoto final ($g \cdot L^{-1}$); X_i = concentração da biomassa inicial ($g \cdot L^{-1}$); N_i = concentração da fonte de azoto inicial ($g \cdot L^{-1}$); N_f = concentração da fonte de azoto final ($g \cdot L^{-1}$).

4.6.20. Rendimento dos lípidos totais em relação à fonte de carbono

Sabendo-se as concentrações da fonte de carbono (**itens 4.6.6 e 4.6.7**) inicial e final (no final do ensaio ou ao esgotar-se) e a concentração dos lípidos totais (**item 4.6.13**) formada no mesmo período chega-se ao rendimento dos lípidos totais em relação à fonte de carbono pela equação:

$$Y_{LT/C} = \frac{LT_f - LT_i}{C_i - C_f}$$

Equação 7. Rendimento dos lípidos totais em relação à fonte de carbono. Onde: $Y_{LT/C}$ = rendimento dos lípidos totais em relação à fonte de carbono ($g_{\text{lípidos}} \cdot g_{\text{substrato consumido}}^{-1}$); LT_f = concentração de lípidos totais correspondente à da fonte de carbono final ($g \cdot L^{-1}$); LT_i = concentração de lípidos totais inicial ($g \cdot L^{-1}$); C_i = concentração da fonte de carbono inicial ($g \cdot L^{-1}$); C_f = concentração da fonte de carbono final ($g \cdot L^{-1}$).

4.6.21. Produtividade volumétrica da biomassa

Sabendo-se as concentrações da biomassa (**item 4.6.4**) da amostra a ser analisada e da amostra inicial calcula-se a produtividade volumétrica da biomassa pela equação:

$$P_X = \frac{X - X_i}{\Delta t}$$

Equação 8. Produtividade volumétrica da biomassa. Onde: P_X = produtividade volumétrica da biomassa ($\text{g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); X = concentração da biomassa ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); X_i = concentração da biomassa da amostra inicial ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); Δt = intervalo de tempo decorrido (h).

4.6.22. Produtividade volumétrica dos lípidos totais.

Sabendo-se as concentrações de lípidos totais (**item 4.6.13**) da amostra a ser analisada e da amostra inicial calcula-se a produtividade volumétrica dos lípidos totais pela equação:

$$P_{LT} = \frac{LT - LT_i}{\Delta t}$$

Equação 9. Produtividade volumétrica dos lípidos totais. Onde: P_{LT} = produtividade volumétrica dos lípidos totais ($\text{g}_{\text{lípidos}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); LT = concentração dos lípidos totais ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); LT_i = concentração dos lípidos totais da amostra inicial ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); Δt = intervalo de tempo decorrido (h).

5. Resultados e discussão

5.1. Estudo prévio em frascos agitados

5.1.1. Optimização da aplicação do Vermelho do Nilo

A optimização das condições de coloração das células de *R. glutinis* com o Vermelho do Nilo realizou-se em duas etapas. A primeira através da optimização do volume de corante (Figura 6, a) a ser aplicado, e a segunda através da optimização do tempo de incubação a 37°C após aplicação (Figura 6, b), de forma a encontrar as condições que produzissem a máxima intensidade de fluorescência.

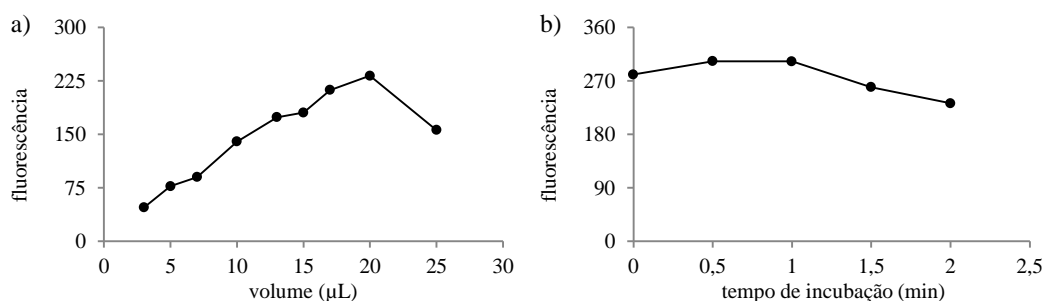


Figura 6. Optimização do uso do Vermelho do Nilo ao corar amostras de *R. glutinis*. O gráfico “a” apresenta a relação entre o volume aplicado de corante e a fluorescência. O gráfico “b” apresenta a relação entre o tempo de incubação do corante e a fluorescência.

Verificou-se que o volume ao qual a fluorescência era mais intensa era 20 μL (Figura 6, a). Em seguida verificou-se que o tempo de incubação da amostra, após aplicação dos 20 μL ao qual a fluorescência, era mais intensa poderia ser 30 segundos ou 1 minuto (Figura 6, b). Para fins de optimização optou-se por escolher 30 segundos como tempo de incubação a 37°C, após aplicação dos 20 μL de Vermelho do Nilo às amostras de *R. glutinis*.

5.1.2. Correlação entre a fluorescência e o teor de lípidos totais

A **Figura 7** apresenta a correlação entre a fluorescência e os lípidos totais.

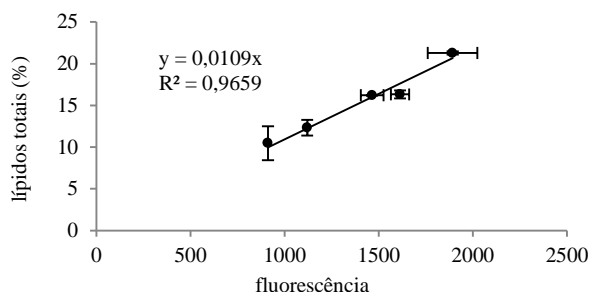


Figura 7. Gráfico da correlação entre a fluorescência e o teor de lípidos totais.

A recta da correlação da fluorescência versus teor de lípidos totais passa pelo ponto zero em ambos os eixos e é constituída por cinco pontos. Apresenta um coeficiente de correlação de 0,9659 e é representada pela equação $y = 0,0109x$.

A correlação entre a fluorescência emitida pelas células de *R. glutinis* coradas com Vermelho do Nilo e o seu teor em lípidos não é inédita. Tendo sido já estabelecida para a estirpe *Rhodotorula glutinis* CCMI 145 por da Silva *et al* [33]. Naquele trabalho o método gravimétrico utilizado para correlacionar os lípidos totais com a fluorescência do Vermelho do Nilo foi o soxlet, e o pré-tratamento da biomassa liofilizada da levedura foi constituído de maceração em almofariz com areia de quartzo.

O declive da recta da correlação apresentada para a levedura *R. glutinis* CCMI 145 ($y = 0,014x + 1,1398$) foi aproximadamente o mesmo que o apresentado neste trabalho ($0,014 \approx 0,0109$). Porém, tal recta não passa pelo ponto zero da abcissa, como a recta apresentada no presente trabalho, além de possuir um coeficiente de correlação mais baixo: 0,836 contra 0,969.

5.1.3. Estudo do crescimento da levedura

O ensaio em frascos agitados foi realizado para se estabelecer uma correlação entre a fluorescência do Vermelho do Nilo e o teor de lípidos totais. A **Figura 8** apresenta gráficos de parâmetros ao longo da cultura que caracterizam este ensaio. A **Tabela 3** apresenta os teores em ácidos gordos da biomassa. Este ensaio foi realizado utilizando um meio com pH inicial de 5,5 formulado por Yoon e Rhee para a limitação de azoto (**Tabela 1; I**) e teve uma duração de 72 horas.

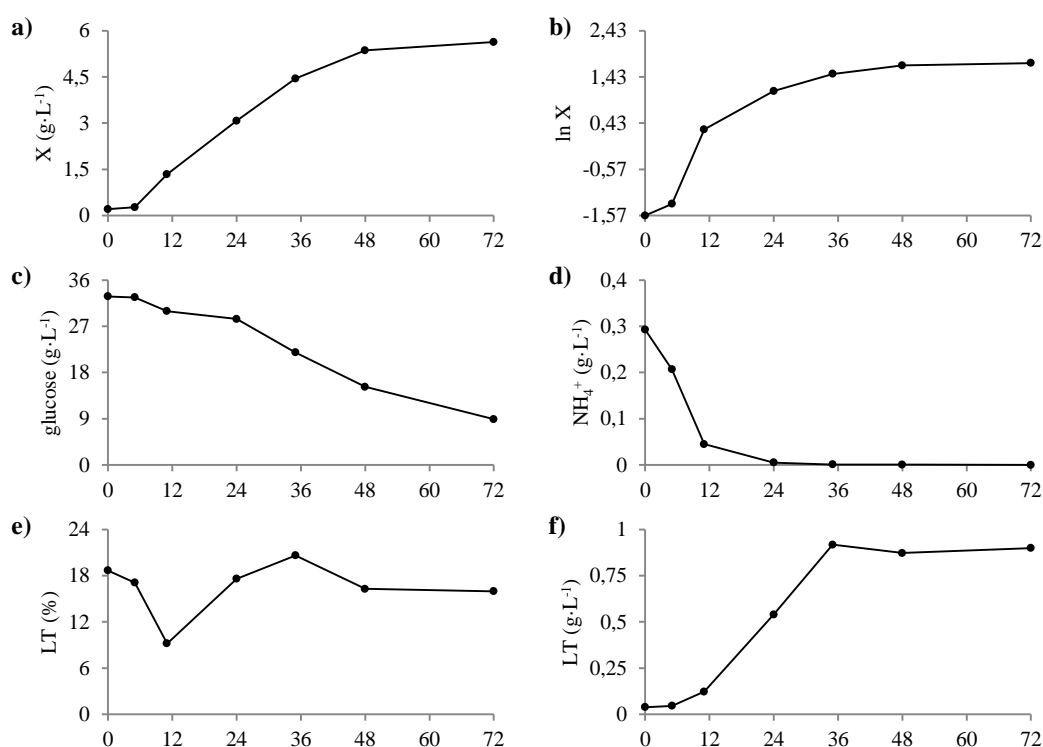


Figura 8. Evolução dos parâmetros medidos ou calculados na cultura em frascos agitados. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: a) concentração da biomassa; b) evolução do logaritmo natural da concentração da biomassa; c) concentração da glucose; d) concentração do amónio; e) percentagem de lípidos totais; f) concentração de lípidos totais.

Por observação gráfica (**Figura 8; b**), descreve-se uma fase de aceleração do início do ensaio até às 5 horas, seguida de um crescimento exponencial até às 11 horas a uma taxa específica de crescimento (μ) de $0,27 \text{ h}^{-1}$. Às 11 horas inicia-se a fase de desaceleração que termina às 48 horas e a partir daí inicia-se a fase estacionária que dura até o final do ensaio.

A uma taxa volumétrica de consumo de glucose (r_{GLU}) de $0,33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a fonte de carbono (glucose) não chega a esgotar-se durante o ensaio (**Figura 8; c**), porém tal como esperado, a uma taxa volumétrica de consumo de azoto ($r_{\text{NH}_4^+}$) de $0,012 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a fonte de azoto esgota-se por volta das 11 às 24 horas (**Figura 8; d**). Analisando-se o gráfico da concentração da fonte de azoto (**Figura 8; d**) juntamente com o gráfico do logaritmo natural da bio-

massa (**Figura 8; b**) sugere-se que o final da fase exponencial pode ter sido devido à limitação de azoto.

O perfil do teor de lípidos totais (**Figura 8; e**) mostra-se inicialmente alto, provavelmente devido à influência do pré-núcleo. Em seguida decresce bastante até o final da fase exponencial e a partir daí inicia um crescimento atingindo às 35 horas o seu pico: 20,6%. Porém, depois de alcançar o valor máximo, decresce um pouco e estabiliza até o final do ensaio em cerca de 16%. Tal diminuição do teor de lípidos sugere que um nutriente necessário à síntese de lípidos possa ter esgotado para além do azoto. A manutenção celular requer a utilização de reservas celulares (lípidos neutros) e com isso a diminuição do teor de lípidos totais.

O perfil da concentração de lípidos totais indica que a maior concentração atingida foi $0,92 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ às 35 horas (**Figura 8; f**). Este máximo de concentração de lípidos totais não coincide com o momento em que se alcança a concentração de biomassa máxima ($5,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ às 72 horas) (**Figura 8; a**).

A análise da composição em FAMES ao longo da cultura em frascos agitados mostrou que o ácido oleico (18:1 ω 9) e o ácido linoleico (18:2 ω 6) foram os ésteres metílicos dominantes. Os níveis dos ácidos mirístico (14:0), palmitoleico (16:1 ω 7) e eicosanóico (20:0) mantiveram-se sempre baixos. Já os níveis dos ácidos palmítico (16:0) e linoleico (18:2 ω 6) aumentaram durante o ensaio (**Tabela 3**).

Tabela 3. Composição em ácidos gordos, proporção entre saturados e insaturados e percentagem total em relação à biomassa das amostras em frascos agitados. Valores da composição em ácidos gordos em %. Valores mais altos em destaque. Os resultados para a proporção são adimensionais.

Tempo (h)	14:0 mirístico	16:0 palmítico	16:1 ω 7 palmitoleico	18:0 esteárico	18:1 ω 9 oleico	18:2 ω 6 linoleico	18:3 ω 6 γ -linoleico	20:0 eicosanóico	$\frac{\sum \text{sat}}{\sum \text{insat}}$	% de X
0	0,9 \pm 0,2	16,3 \pm 2,3	1,8 \pm 0,3	10,3 \pm 0,2	45,8 \pm 1,1	10,6 \pm 0,2	8,4 \pm 0,3	5,9 \pm 2,0	0,5	2,25
5	0,7 \pm 0,3	16,3 \pm 0,7	1,5 \pm 0,1	7,0 \pm 0,3	41,6 \pm 1,1	19,5 \pm 0,5	9,4 \pm 0,0	4,0 \pm 1,8	0,4	3,32
11	0,7 \pm 0,0	14,3 \pm 0,0	0,9 \pm 0,2	6,6 \pm 0,4	24,6 \pm 1,3	29,6 \pm 0,4	19,5 \pm 1,2	3,8 \pm 0,1	0,3	4,69
24	0,8 \pm 0,2	16,5 \pm 2,4	0,9 \pm 0,0	12,9 \pm 0,4	33,5 \pm 0,4	20,5 \pm 0,1	12,5 \pm 2,4	2,4 \pm 0,1	0,5	8,30
35	1,1 \pm 1,0	20,9 \pm 6,2	0,6 \pm 0,4	10,3 \pm 1,6	37,3 \pm 2,5	21,2 \pm 0,6	6,9 \pm 1,2	1,7 \pm 1,2	0,5	13,48
48	0,8 \pm 0,1	16,2 \pm 2,2	0,6 \pm 0,2	10,6 \pm 0,2	42,0 \pm 1,1	22,8 \pm 1,5	6,2 \pm 0,3	0,8 \pm 0,0	0,4	15,18
72	0,7 \pm 0,5	19,7 \pm 1,4	0,6 \pm 0,4	9,4 \pm 0,5	36,2 \pm 1,8	25,3 \pm 0,4	7,5 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	0,4	15,22

A composição obtida vai de encontro ao referenciado pela literatura variando somente em alguns casos o ácido gordo dominante. Perrier *et al* [5] descreveu os ácidos oleico e linoleico como sendo os maioritários, nesta ordem, para a *R. glutinis* CBS 20. Dai *et al* [2], observaram que os ácidos gordos maioritários, em uma estirpe selvagem de *R. glutinis*, eram o oléico (67%) seguido pelo palmítico (19%). Kaneko *et al* [36], observaram que na *R. glutinis* H3-9-1 da *Faculty of Engineering of Yamanashi University* o ácido linoleico era o mais abun-

dante (53%) seguido pelo ácido oléico (32%), tal como observado às 11 horas no ensaio do presente trabalho (**Tabela 3**). Alvarez *et al* [9] verificaram que o ácido oléico era maioritário (55%) seguido do ácido palmítico (30%) na *R. glutinis* L/24-2-1 da *Collection of the Cuban Research Institute of Sugar Cane By-Products*. Estas diferenças dependem das condições de cultivo.

No que se refere à caracterização do óleo da levedura do presente trabalho para o uso na produção de biodiesel, este adequa-se tanto às normas européia, alemã e norte-americana (**Anexo II** - Normas para a produção de biodiesel). Haja vista que, não apresenta em sua composição o metil éster do ácido linoléico ómega 3 (18:3 ω 3) assim como também não apresenta algum metil éster com quatro ou mais ligações duplas.

5.2. Desenvolvimento da *R. glutinis* em meio com limitação de azoto a pH 5,5

Após o estabelecimento da correlação entre a fluorescência do Vermelho do Nilo e os lípidos totais, realizou-se uma fermentação em biorreactor para estudar o desenvolvimento e a produtividade lipídica da *R. glutinis* em meio formulado para a limitação da fonte de azoto (Tabela 1; III). A Figura 9 mostra os perfis dos parâmetros medidos e calculados ao longo da fermentação.

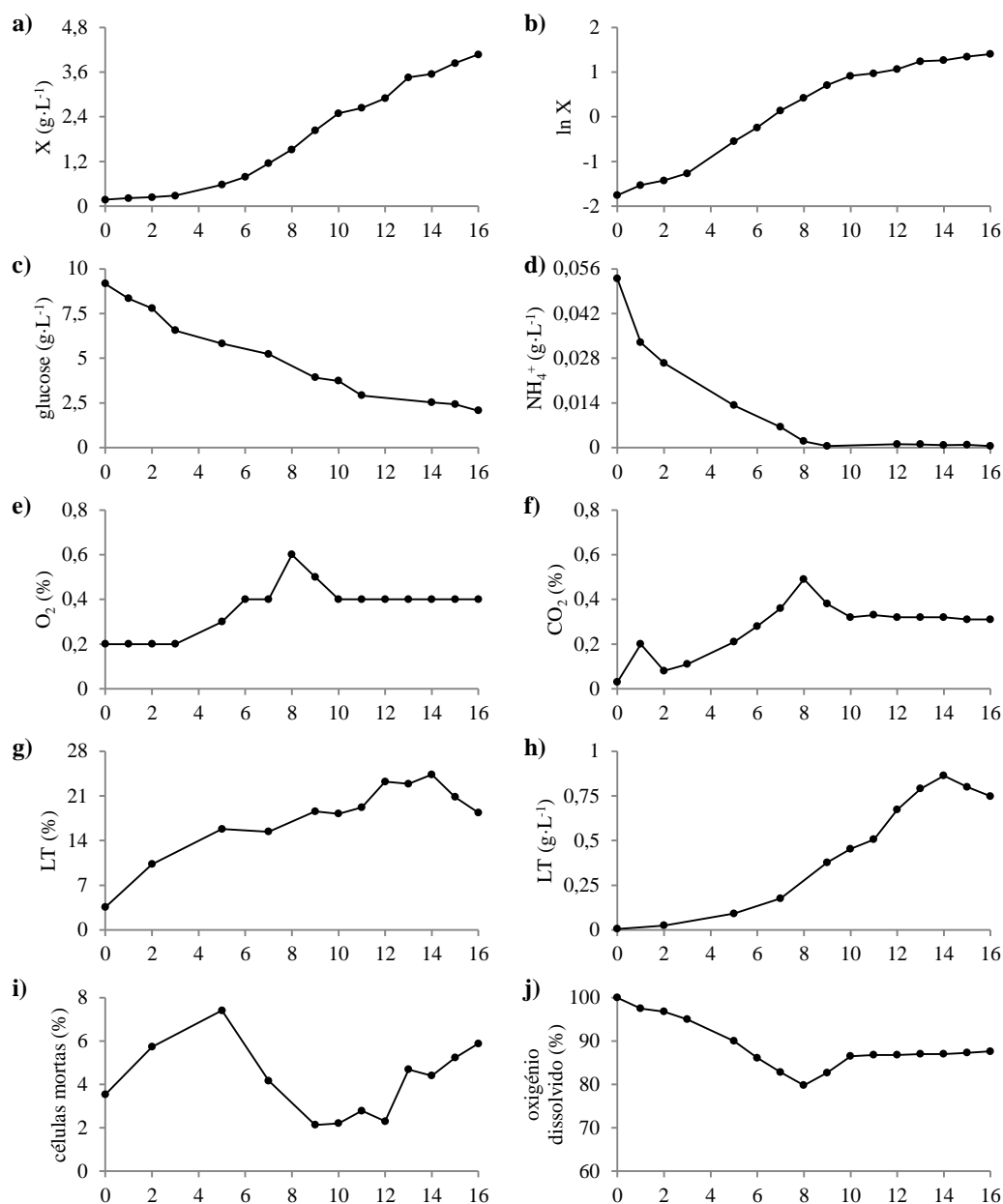


Figura 9. Evolução dos parâmetros medidos ou calculados na cultura descontínua limitada pelo azoto a pH 5,5. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: a) concentração da biomassa; b) evolução do logaritmo natural da concentração da biomassa; c) concentração da glucose; d) concentração do amónio; e) percentagem de oxigénio consumido; f) percentagem de dióxido de carbono produzido; g) percentagem de lípidos totais; h) concentração de lípidos totais; i) percentagem de células mortas; j) percentagem de oxigénio dissolvido.

A fermentação foi realizada em pH 5,5 constante e teve duração de 16 horas. Por observação gráfica (**Figura 9; b**), observou-se uma fase de aceleração do início do ensaio até às 3 horas, seguida de um crescimento exponencial das 3 às 8 horas a uma taxa específica de crescimento (μ) de $0,34 \text{ h}^{-1}$. Às 8 horas inicia-se uma desaceleração até o fim do ensaio.

Com uma taxa volumétrica de consumo de glucose (r_{GLU}) de $0,44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ não observou-se esgotamento da fonte de carbono (glucose) (**Figura 9; c**). No entanto, a uma taxa volumétrica de consumo de azoto ($r_{\text{NH}_4^+}$) de $0,006 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ há o esgotamento da fonte de azoto por volta das 8 horas de ensaio (**Figura 9; d**).

No momento em que há o esgotamento da fonte de azoto nota-se a diminuição da actividade celular reflectida pela diminuição do consumo de oxigénio e produção de dióxido de carbono pela cultura (**Figura 9; e, f**). Tal facto sugere que o final da fase exponencial foi devido à limitação da fonte de azoto, haja vista que o oxigénio dissolvido no meio esteve sempre em excesso e, portanto, não houve limitação na transferência deste (**Figura 9; o**).

O perfil da concentração de biomassa ao longo do tempo (**Figura 9; a**) mostra que desde o início do ensaio esta não parou de crescer. O ensaio iniciou-se com uma concentração de biomassa de $0,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e após 16 horas atingiu $4,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

O perfil do teor de lípidos totais (**Figura 9; g**) apresenta uma subida gradativa que culmina às 14 horas atingindo: 24,3%. Após as 14 horas há uma diminuição do teor de lípidos totais. O perfil da concentração de lípidos totais (**Figura 9; h**) mostra-se crescente até atingir a máxima concentração ($0,86 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) às 14 horas. Depois inicia uma descida até o fim do ensaio acabando este com $0,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A análise da percentagem de células mortas (**Figura 9; i**) mostra um aumento de cerca de 4% durante as cinco primeiras horas de ensaio, vindo a diminuir bastante durante a fase de crescimento exponencial. No entanto, um pouco antes de se alcançar o máximo teor e a máxima concentração de lípidos totais, iniciou-se um aumento gradativo da percentagem de células mortas até o final do ensaio (**Figura 9; g, h**). Tal facto sugere que provavelmente houve o esgotamento de outro nutriente essencial presente no meio, para além do azoto.

O teor máximo de lípidos totais obtido (24,3%) foi menor que o referenciado por Granger *et al* [22], que alcançaram cerca de 27,5% efectuando uma cultura em descontínuo em meio contendo glucose como fonte de carbono e formulado para a limitação de azoto. Acredita-se que esta diferença deva-se pela maior oferta de sais na composição do meio elaborado por aquele trabalho evitando-se dessa forma o esgotamento de outro nutriente além do azoto, como ocorreu neste trabalho.

5.3. Desenvolvimento da *R. glutinis* em meio com limitação de carbono a pH 5,5

Após a realização da cultura em biorreactor com meio formulado para a limitação de azoto, fez-se um novo ensaio com o intuito de analisar o desenvolvimento e a produtividade lipídica da *R. glutinis* em meio formulado para a limitação de carbono (**Tabela 1; II**). A **Figura 10** mostra os parâmetros medidos e calculados ao longo do desenvolvimento da cultura.

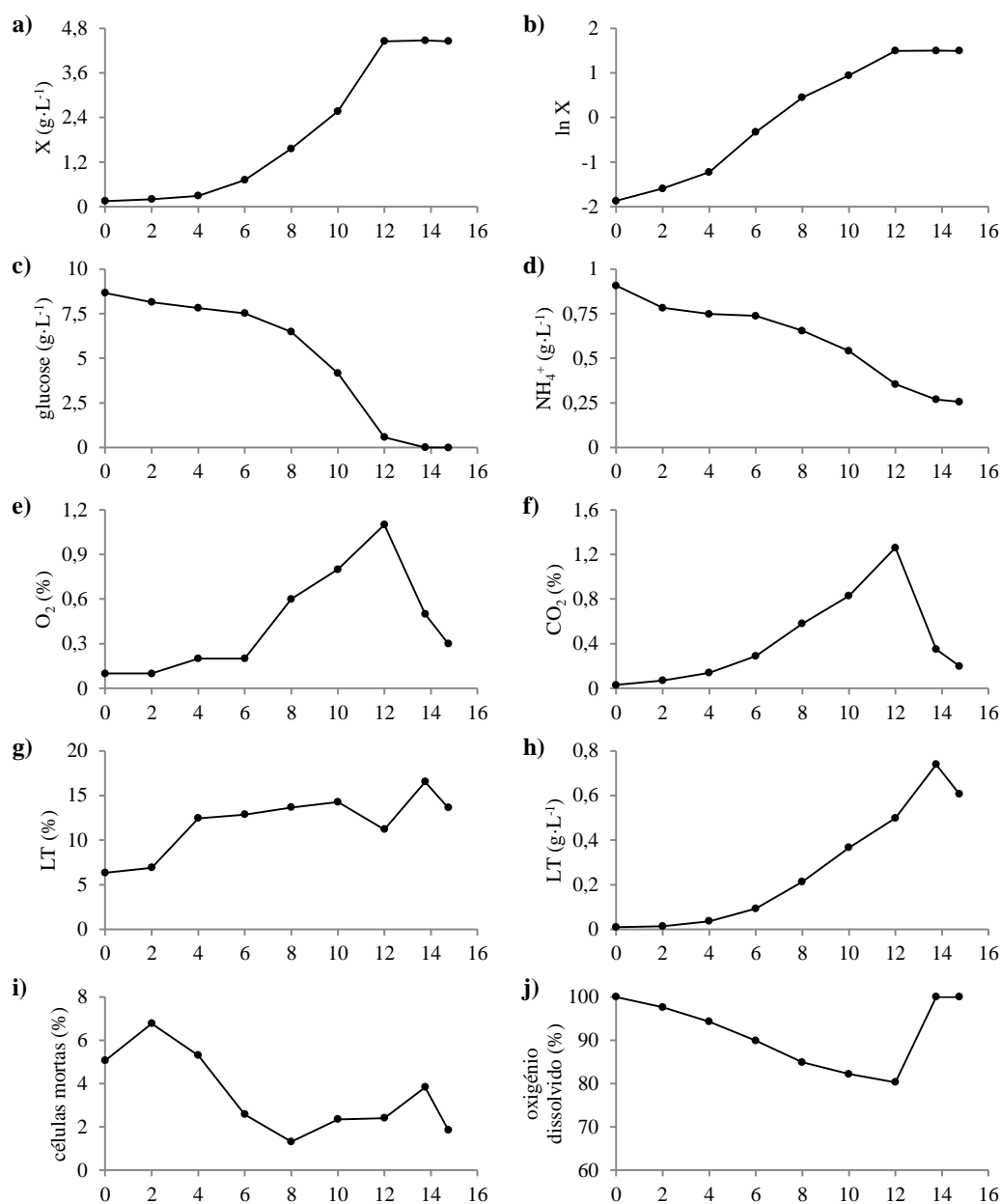


Figura 10. Evolução dos parâmetros medidos ou calculados na cultura descontínua limitada pelo carbono a pH 5,5. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: a) concentração da biomassa; b) evolução do logaritmo natural da concentração da biomassa; c) concentração da glucose; d) concentração do amónio; e) percentagem de oxigénio consumido; f) percentagem de dióxido de carbono produzido; g) percentagem de lípidos totais; h) concentração de lípidos totais; i) percentagem de células mortas; j) percentagem de oxigénio dissolvido.

Essa fermentação foi realizada em pH 5,5 constante, e teve duração de 14 horas e 45 minutos. Por observação gráfica (**Figura 10; b**), observou-se uma fase de aceleração do início do ensaio até às 4 horas, seguida de um crescimento exponencial das 4 às 8 horas a uma taxa específica de crescimento (μ) de $0,42 \text{ h}^{-1}$. Às 8 horas inicia-se uma desaceleração que termina às 12 horas e a partir daí inicia-se a fase estacionária que perdura até o final do ensaio.

A uma taxa volumétrica de consumo de azoto ($r_{\text{NH}_4^+}$) de $0,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ não houve esgotamento da fonte de azoto, tal como esperado (**Figura 10; d**), entretanto, a uma taxa volumétrica de consumo de glucose (r_{GLU}) de $0,67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ verificou-se o esgotamento da fonte de carbono (glucose) que ocorreu por volta das 12 horas (**Figura 10; c**). Neste momento notam-se as diminuições do consumo de oxigénio e produção de dióxido de carbono pela cultura (**Figura 10; e, f**). Tais factos somados à observação de que o oxigénio dissolvido no meio esteve sempre em grande quantidade (sem que houvesse qualquer limitação por sua parte) (**Figura 10; j**) sugerem que o final da fase exponencial deva-se ao esgotamento da fonte de carbono (glucose).

O perfil da concentração da biomassa (**Figura 10; a**) indica que após 12 horas de ensaio atingiu-se a máxima concentração desta: $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir daí até o final do ensaio, a concentração da biomassa manteve-se constante.

O gráfico do teor de lípidos totais (**Figura 10; g**) mostra uma subida gradativa do teor lipídico que atinge às 13 horas e 45 minutos o máximo teor de lípidos totais obtido no ensaio: 16,5%. Após o máximo ocorreu uma diminuição do teor de lípidos totais até o fim do ensaio.

O perfil da concentração de lípidos totais indica que a maior concentração atingida foi $0,74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ às 13 horas e 45 minutos (**Figura 10; h**). Após se atingir a máxima concentração observa-se um declínio tal como evidenciado no gráfico do teor de lípidos (**Figura 10; g**).

A percentagem de células mortas esteve sempre baixa não ultrapassando os 7% (**Figura 10; i**). O seu perfil mostra um ligeiro aumento da percentagem de células mortas na fase de aceleração, durante a fase exponencial de crescimento há uma diminuição brusca na percentagem de células mortas provavelmente devido ao rápido aumento do número de células nessa fase. Durante a fase de desaceleração observa-se um aumento gradativo da percentagem de células mortas que tendeu a continuar na fase estacionária.

5.4. Influência do nutriente limitante no desenvolvimento da *R. glutinis*.

Utilizando-se dos ensaios realizados em biorreactor com meio formulado para a limitação de azoto (item 5.2) e com meio formulado para a limitação de carbono (item 5.3), ambos a pH 5,5 constante, pôde-se analisar a influência do nutriente limitante no desenvolvimento e produtividade lipídica da *R. glutinis* através da comparação dos parâmetros cinéticos calculados para os dois ensaios (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros cinéticos das culturas em biorreactor limitadas pelo carbono e pelo azoto.

Parâmetros	Limitação pelo azoto	Limitação pelo carbono
μ	0,34 h ⁻¹	0,42 h ⁻¹
$Y_{X/C}$	0,55 g·g ⁻¹	0,53 g·g ⁻¹
$Y_{X/N}$	26,5 g·g ⁻¹	6,75 g·g ⁻¹
$Y_{LT/C}$	0,105 g·g ⁻¹	0,06 g·g ⁻¹
$X_{m\acute{a}x}$	4,1 g·L ⁻¹ (16 h)	4,5 g·L ⁻¹ (13,75 h)
$LT_{m\acute{a}x}$	0,86 g·L ⁻¹ (14 h)	0,74 g·L ⁻¹ (13,75 h)
$P_{Xm\acute{a}x}$	0,25 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ (13 h)	0,36 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ (12 h)
$P_{LTm\acute{a}x}$	0,06 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ (14 h)	0,05 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ (13,75 h)

A análise comparativa dos crescimentos em meio formulado para limitação de azoto e em meio formulado para limitação de carbono (Tabela 4) mostra que para cada 100 g de glucose consumida formou-se 55 g de biomassa e 10,5 g de lípidos totais no ensaio com limitação de azoto ante 53 g de biomassa e 6 g de lípidos totais no ensaio com limitação de carbono. Observa-se que o rendimento da biomassa pela fonte de azoto foi bem maior na limitação pelo azoto que na limitação pelo carbono.

A $X_{m\acute{a}x}$ foi ligeiramente superior e atingida 2 horas e 15 minutos mais cedo na cultura com limitação de carbono. A $LT_{m\acute{a}x}$ foi superior no ensaio com limitação de azoto. A $P_{Xm\acute{a}x}$ atingida foi superior na limitação de carbono. A $P_{LTm\acute{a}x}$ atingida foi superior na limitação de azoto. O μ foi mais alto para a limitação de carbono, mostrando que o crescimento neste meio foi superior.

Esses dados sugerem que dos dois meios comparados o meio formulado para limitação de carbono é mais indicado para o desenvolvimento de biomassa e o meio formulado para a limitação de azoto é mais indicado para a acumulação de reservas (lípidos). De facto, o teor de lípidos da *R. glutinis* teve um aumento de 20,7% em 14 horas de cultura em meio com limitação de azoto contra 10,3% de aumento em 13 horas e 45 minutos de cultura em meio com limitação de carbono.

5.5. Desenvolvimento da *R. glutinis* em meio com limitação de carbono a pH 7

Acidentalmente uma cultura desenvolvida em biorreactor com meio formulado para a limitação de carbono (item 5.3) foi realizada a pH 7 constante, ao invés de pH 5,5. Aproveitando este incidente, os dados foram recolhidos e utilizados para a análise da influência do pH 7 no desenvolvimento da *R. glutinis*. Assim, a **Figura 11** apresenta a evolução dos parâmetros medidos ou calculados que caracterizam o desenvolvimento da *R. glutinis* a pH 7 constante em meio formulado para a limitação de carbono.

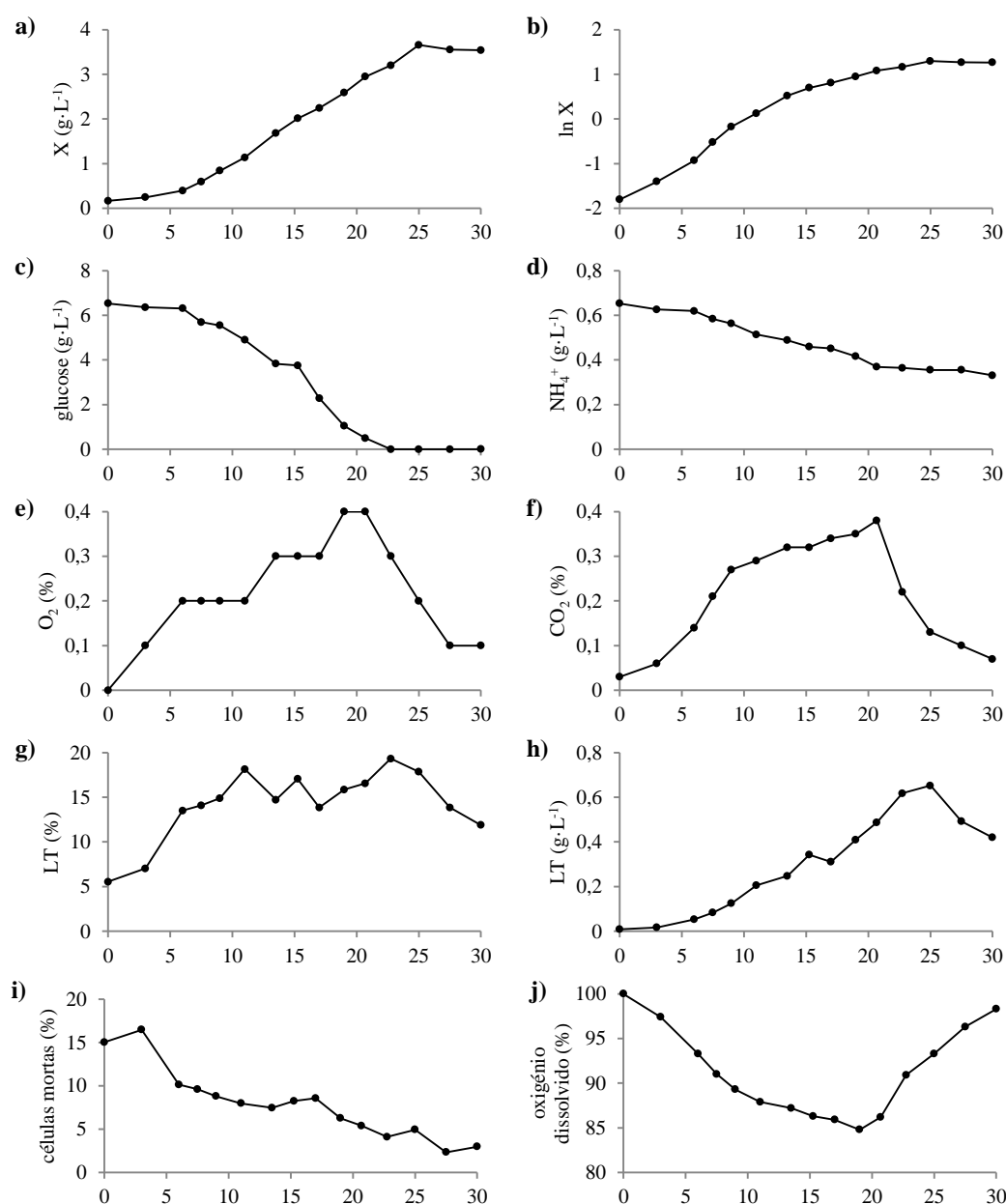


Figura 11. Evolução dos parâmetros medidos ou calculados na cultura descontínua limitada pelo carbono a pH 7. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: a) concentração da biomassa; b) evolução do logaritmo natural da concentração da biomassa; c) concentração da glucose; d) concentração do amônio; e) percentagem de oxigênio consumido; f) percentagem de dióxido de carbono produzido; g) percentagem de lípidos totais; h) concentração de lípidos totais; i) percentagem de células mortas; j) percentagem de oxigênio dissolvido.

Este ensaio foi realizado utilizando um meio formulado para limitação de carbono (**Tabela 1; II**) a pH 7 constante e teve duração de 30 horas. Observando-se o gráfico do logaritmo natural da biomassa pelo tempo (**Figura 11; b**) descreve-se uma fase de aceleração do início do ensaio até às 6 horas, seguida de um crescimento exponencial das 6 às 9 horas a uma taxa específica de crescimento (μ) de $0,25 \text{ h}^{-1}$. Às 9 horas inicia-se uma desaceleração que termina às 25 horas e a partir daí inicia-se a fase estacionária que dura até o final do ensaio.

Apresentando uma taxa volumétrica de consumo de azoto ($r_{\text{NH}_4^+}$) de $0,011 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a fonte de azoto não esgotou durante o ensaio (**Figura 11; d**). A uma taxa volumétrica de consumo de glucose (r_{GLU}) de $0,29 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a glucose esgotou por volta das 20 horas e 40 minutos (**Figura 11; c**). Neste momento notam-se as diminuições do consumo de oxigénio e produção de dióxido de carbono pela cultura (**Figura 11; e, f**). Tais factos somados ao excesso de oxigénio dissolvido no meio de cultura (**Figura 11; j**) sugerem que o final da fase de desaceleração deveu-se ao esgotamento da glucose.

O perfil da concentração de biomassa (**Figura 11; a**) indica que após 25 horas de ensaio atingiu-se a máxima concentração de biomassa, $3,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir desse momento até o final do ensaio, cerca de 5 horas, a concentração da biomassa basicamente manteve-se, terminando este em $3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

O gráfico do teor de lípidos totais (**Figura 11; g**) mostra uma subida progressiva que culmina às 22 horas e 45 minutos, com o teor máximo de lípidos totais obtido no ensaio, 19,3%. Após o alcance do teor máximo há uma diminuição gradativa do teor de lípidos totais até o final do ensaio.

O perfil da concentração de lípidos totais indica que a maior concentração atingida foi $0,65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ às 25 horas (**Figura 11; h**). Após se atingir a máxima concentração observou-se um declínio já evidenciado no gráfico do teor de lípidos totais (**Figura 11; g**). A máxima concentração de lípidos coincidiu com o fim da fase de desaceleração e início da fase estacionária.

A percentagem de células mortas (**Figura 11; i**) apresentou-se bastante elevada no início do ensaio alcançando os 16,5%. Diminuiu bastante durante a fase de crescimento exponencial devido ao rápido aumento do número de células. Ao longo da fase de desaceleração diminuiu gradativamente. Terminou o ensaio com uma percentagem de 3% de células mortas, porém, tendendo para um aumento desse percentual.

5.6. Influência do pH no desenvolvimento da *R. glutinis*

Utilizando-se dos ensaios realizados em biorreactor com meio formulado para a limitação de carbono com pH 5,5 constante (item 5.3) e com meio formulado para a limitação de carbono com pH 7 constante (item 5.5) pôde-se analisar a influência do pH no desenvolvimento e produtividade lipídica da *R. glutinis* através da comparação dos parâmetros cinéticos calculados para os dois ensaios (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros cinéticos das culturas em biorreactor limitadas pelo carbono em pH 5,5 e 7.

Parâmetros	pH 5,5	pH 7
μ	0,42 h ⁻¹	0,28 h ⁻¹
$Y_{X/C}$	0,53 g·g ⁻¹	0,46 g·g ⁻¹
$Y_{X/N}$	6,75 g·g ⁻¹	10,5 g·g ⁻¹
$Y_{LT/C}$	0,06 g·g ⁻¹	0,08 g·g ⁻¹
$X_{máx}$	4,5 g·L ⁻¹ (13,75 h)	3,7 g·L ⁻¹ (25 h)
$LT_{máx}$	0,74 g·L ⁻¹ (13,75 h)	0,65 g·L ⁻¹ (25 h)
$P_{Xmáx}$	0,36 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ (12 h)	0,14 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ (25 h)
$P_{LTmáx}$	0,053 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ (13,75 h)	0,027 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ (22,75 h)

Ao analisar os parâmetros cinéticos observa-se que a cultura a pH 5,5 apresentou melhores resultados em todos os parâmetros analisados excepto no rendimento de lípidos totais em relação à glucose consumida ($Y_{LT/C}$). Observa-se que para cada 100 g de glucose consumida, 53 g de biomassa e 6 g de lípidos totais foram produzidos na cultura a pH 5,5, enquanto que na cultura a pH 7 para cada 100 g de glucose consumida 46 g de biomassa e 8 g de lípidos totais foram sintetizados.

A $X_{máx}$ atingida foi 1,8 g·L⁻¹ superior na cultura a pH 5,5, em comparação com a cultura a pH 7, em aproximadamente metade do tempo. A $LT_{máx}$ alcançada também foi mais alta no ensaio a pH 5,5 e também alcançada aproximadamente em metade do tempo da $LT_{máx}$ alcançada no ensaio a pH 7.

A $P_{Xmáx}$ alcançada a pH 5,5 foi cerca de 2,5 vezes superior e alcançada 13 horas antes, comparada a $P_{Xmáx}$ em pH 7, além de ter sido alcançada em quase metade do tempo. A $P_{LTmáx}$ alcançada a pH 5,5 foi cerca de 2 vezes maior e alcançada 9 horas antes comparada a $P_{LTmáx}$ em pH 7. Ainda verifica-se que o μ foi bem mais alto em pH 5,5 que em 7, sugrindo um crescimento mais intenso no primeiro.

Todos esses dados sugerem que o desenvolvimento e a capacidade de produção lipídica é muito superior quando a cultura é realizada a pH 5,5 quando comparada com a cultura a pH 7. Tal facto pode ser explicado pelo gasto energético provocado pela necessidade de manutenção do pH intracelular quando a *R. glutinis* está exposta a um meio com um pH longe da gama óptima para o seu desenvolvimento.

5.7. Cultura descontínua com pulso de carbono

Utilizando como base os dados obtidos pela cultura descontínua em biorreactor em meio formulado para a limitação de carbono (**item 5.3**) efectuou-se uma cultura descontínua com aplicação de um pulso de fonte de carbono (glucose) no fim da fase de desaceleração. A **Figura 12** mostra os parâmetros medidos e calculados ao longo do ensaio.

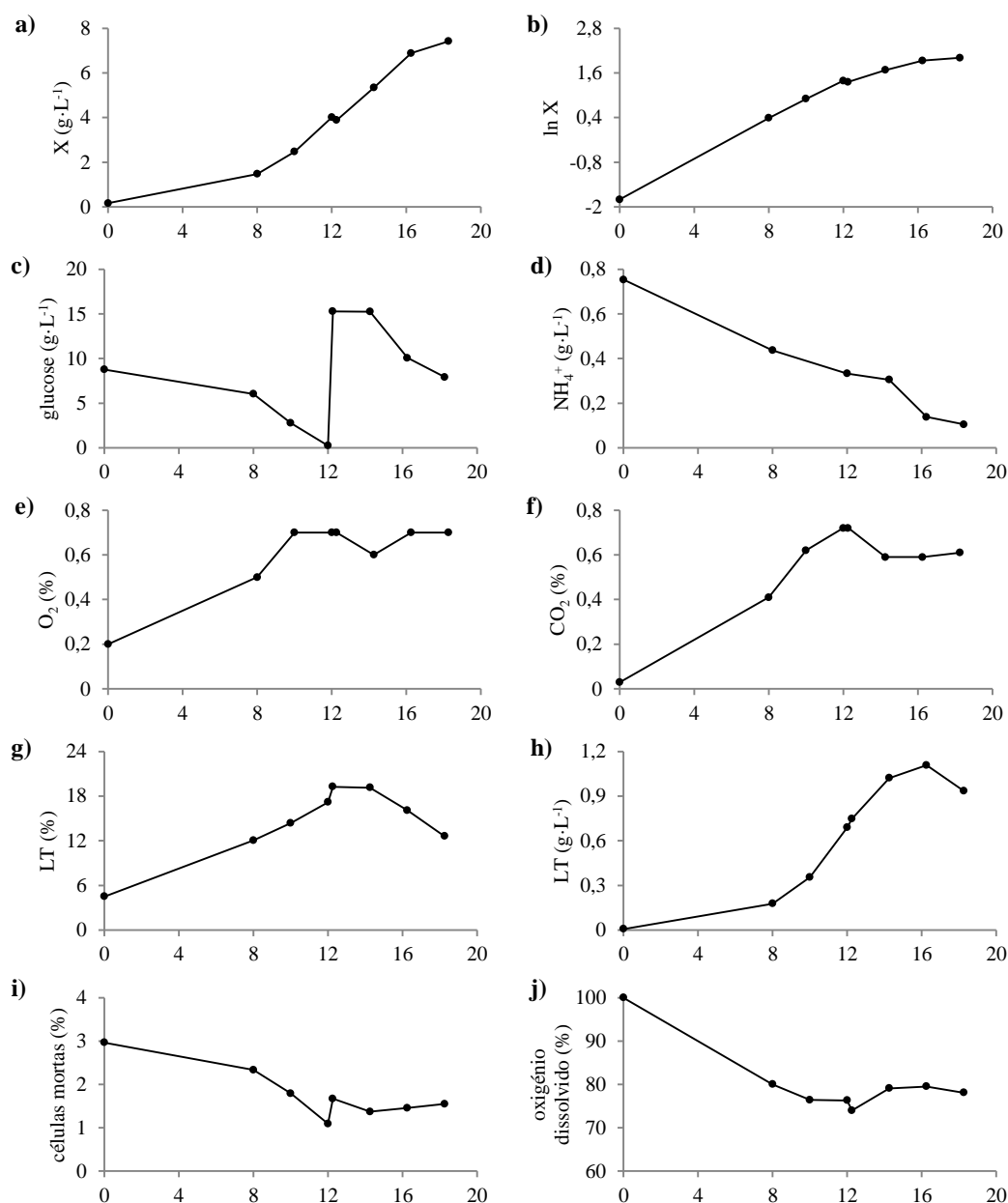


Figura 12. Evolução dos parâmetros medidos ou calculados na cultura descontínua com pulso de carbono. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: a) concentração da biomassa; b) evolução do logaritmo natural da concentração da biomassa; c) concentração da glucose; d) concentração do amónio; e) percentagem de oxigénio consumido; f) percentagem de dióxido de carbono produzido; g) percentagem de lípidos totais; h) concentração de lípidos totais; i) percentagem de células mortas; j) percentagem de oxigénio dissolvido.

Assim, efectuou-se uma fermentação em dois estágios: no primeiro, a levedura foi desenvolvida em meio onde todos os nutrientes estavam em excesso, de forma a induzir o crescimento celular; no segundo, quando as fontes de carbono e azoto estavam a esgotar-se, adicionou-se um pulso de fonte de carbono (glucose) para que a fonte de azoto limitasse o crescimento da levedura e o metabolismo do carbono fosse direccionado para a síntese de lípidos.

O ensaio foi realizado a pH 5,5 constante utilizando um meio formulado para a limitação de carbono (**Tabela 1; II**). Teve uma duração de 18 horas e 15 minutos e caracterizou-se pela aplicação de um pulso de carbono (40 g de glucose em 180 mL de água destilada) à cultura no fim da fase de desaceleração.

Observando o gráfico da evolução do logaritmo natural ao longo do tempo (**Figura 12; b**) nota-se do início até às 12 horas a fase de aceleração e crescimento exponencial (não foram feitas amostragens nessa fase devido ao conhecimento prévio do comportamento da levedura adquirido no ensaio abordado no **item 5.3**). Às 12 horas e 15 minutos aplicou-se o pulso e a partir dele em diante observou-se uma fase de desaceleração.

A uma r_{GLU} de $0,71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a glucose foi consumida até o seu esgotamento por volta das 12 horas e logo em seguida aplicou-se o pulso de carbono que, a uma r_{GLU} pós-pulso de $1,23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ não foi consumida na sua totalidade até o fim do ensaio (**Figura 12; c**). A uma $r_{\text{NH}_4^+}$ de $0,035 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a fonte de azoto não esgotou durante o ensaio e nem mesmo alterou a sua taxa de consumo volumétrico após aplicação do pulso de carbono (**Figura 12; d**).

Através dos gráficos de consumo de oxigénio e produção de dióxido de carbono pela cultura (**Figura 12; e, f**) nota-se que a limitação da glucose diminuiu a actividade celular vindo esta a estabilizar após a aplicação do pulso. Observa-se que o oxigénio dissolvido no meio de cultura esteve sempre alto, não sendo, portanto, limitante na fermentação (**Figura 12; j**).

O perfil da concentração de biomassa ao longo do tempo (**Figura 12; a**) mostra que após a aplicação do pulso de carbono o crescimento da concentração da biomassa continuou, alcançando ao fim de 18 horas e 15 minutos de ensaio $7,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

O perfil do teor de lípidos (**Figura 12; g**) mostra um degrau do ponto em que a glucose esgota-se ao ponto de aplicação do pulso. Após a aplicação do pulso de glucose esse teor de lípidos totais volta a crescer e em seguida inicia uma descida até o fim do ensaio. O máximo teor de lípidos alcançado foi 19,24% logo a seguir a aplicação do pulso de carbono. No entanto, o teor de lípidos não permanece alto por muito tempo após a aplicação do pulso.

Semelhante ao ensaio com limitação de azoto (**item 5.2, Figura 9; e**), por volta das 14 horas de ensaio o teor de lípidos totais inicia a sua queda mesmo com excesso de carbono no

meio de cultura. Tal facto apoia a suposição de que ocorreu o esgotamento de mais algum nutriente ou co-factor essencial à produtividade lipídica nesta altura. Portanto, acredita-se que o teor de lípidos só não acompanhou o crescimento celular devido ao possível esgotamento deste nutriente ou co-factor.

A evolução da concentração de lípidos totais (**Figura 12; h**) mostra uma subida bastante proeminente após aplicação do pulso de carbono até às 16 horas, para em seguida diminuir mesmo com glucose em excesso. Os valores dos rendimentos da biomassa em relação à glucose ($Y_{X/C}$) antes e depois da aplicação do pulso foram: $0,45 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ e $0,48 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. O valor do rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto ($Y_{X/N}$) foi $11,2 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. Em termos de percentagem de células mortas (**Figura 12; i**) nota-se que esta esteve sempre baixa durante o ensaio, não ultrapassando os 3%.

Comparando-se este ensaio com o ensaio da cultura descontínua com limitação pelo carbono (**item 5.3**) observa-se que o pulso de glucose resultou numa maior produção de biomassa no final do ensaio, vindo a alcançar $7,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ao final de 18 horas e 15 minutos, enquanto que na cultura com limitação de carbono sem a aplicação de pulso a biomassa chegou ao seu máximo ($4,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) ao fim de 12 horas, e não mais cresceu devido ao esgotamento da fonte de carbono.

5.8. Desenvolvimento em meio contendo glicerol como fonte de carbono

Esta cultura foi realizada para analisar o crescimento da *R. glutinis* em meio contendo glicerol como única fonte de carbono (Tabela 1; IV). A cultura foi efectuada em pH 5,5 constante e teve duração de 10 horas. A Figura 13 apresenta a evolução dos parâmetros medidos ou calculados que caracterizam o desenvolvimento da *R. glutinis* em glicerol.

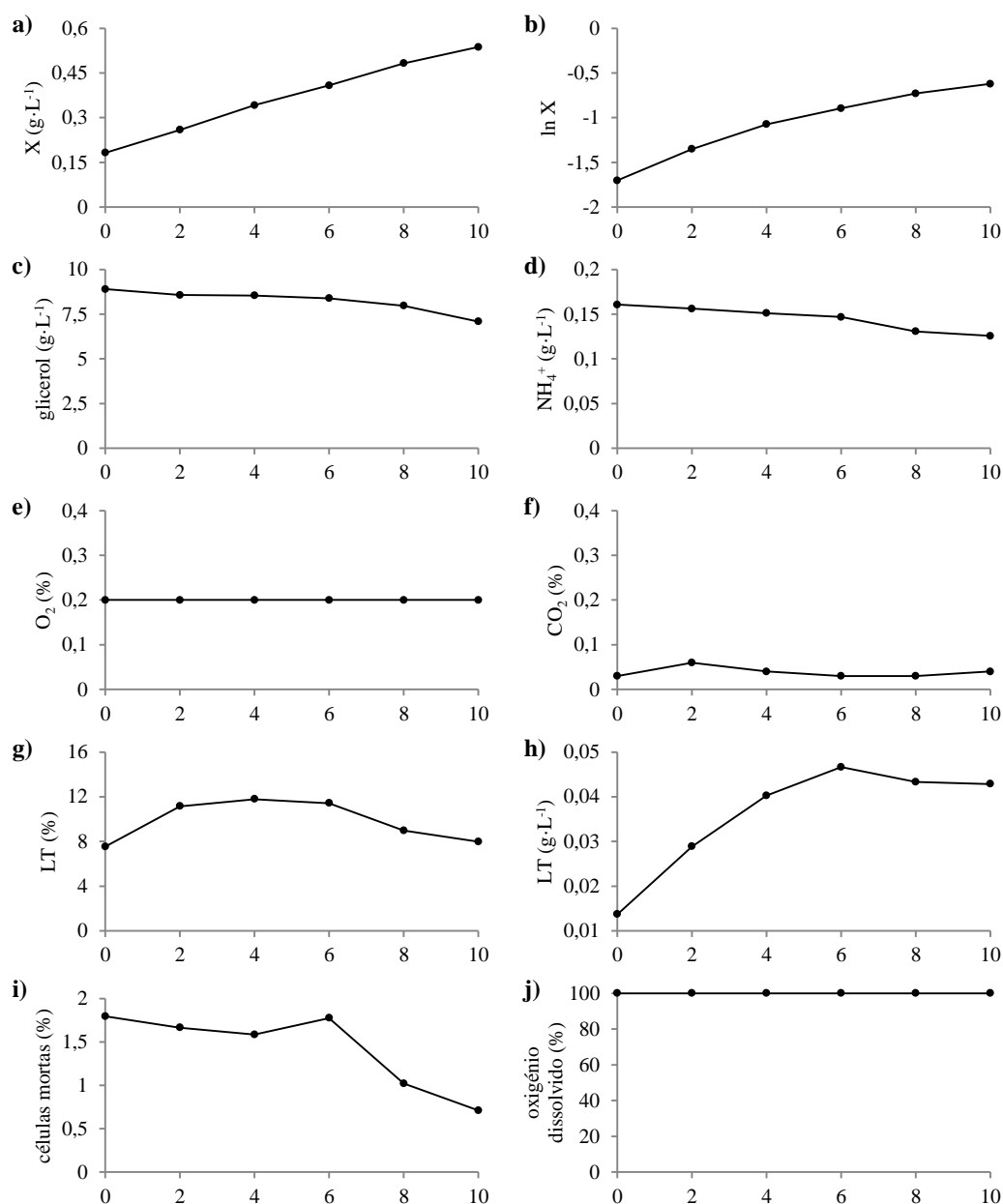


Figura 13. Evolução dos parâmetros medidos ou calculados na cultura descontínua em glicerol. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: a) concentração da biomassa; b) evolução do logaritmo natural da concentração da biomassa; c) concentração da glicose; d) concentração do amónio; e) percentagem de oxigénio consumido; f) percentagem de dióxido de carbono produzido; g) percentagem de lípidos totais; h) concentração de lípidos totais; i) percentagem de células mortas; j) percentagem de oxigénio dissolvido.

Por observação gráfica, verifica-se que não há fases bem definidas (**Figura 13, b**). Apresentando uma r_{GLI} de $0,18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a fonte de carbono (glicerol) não esgotou durante o ensaio (**Figura 13; c**). A uma $r_{NH_4^+}$ de $0,004 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a fonte de azoto também não esgotou (**Figura 13; d**). Nota-se a falta de actividade do microorganismo através das constantes percentagens de consumo de oxigénio e produção de dióxido de carbono (**Figura 13; e, f**) e também no perfil inalterado da percentagem de oxigénio dissolvido (**Figura 13; j**).

A análise do perfil da concentração de biomassa (**Figura 13; a**) ao longo da cultura em glicerol mostra que houve sempre um aumento desta. Passadas 10 horas de ensaio houve um aumento de 300% na concentração de biomassa inicial.

O perfil do teor de lípidos totais (**Figura 13; g**) mostra inicialmente as células com um teor de lípidos totais de 8%. Em seguida esse teor tem um leve aumento de 3,8% chegando a alcançar o máximo após 4 horas (11,8%). A partir das 4 horas inicia-se uma diminuição do teor de lípidos totais terminando o ensaio com o mesmo valor do início (8%). Ao final das 10 horas de ensaio não se nota diferença alguma no teor de lípidos.

O perfil da concentração de lípidos totais (**Figura 13; h**) mostra até às 6 horas um aumento na concentração de lípidos totais (cerca de $0,033 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) devido não só ao aumento do número de células (**Figura 13; b**), mas também ao leve aumento do teor de lípidos totais observado no perfil do mesmo (**Figura 13; g**). Ao fim das 6 horas de ensaio atingiu-se a máxima concentração de lípidos totais, $0,047 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Das 6 horas em diante há uma leve queda da concentração de lípidos totais terminando o ensaio em $0,043 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Em relação à percentagem de células mortas (**Figura 13; i**) verifica-se que esta apresentou-se sempre muito baixa com tendência a diminuir. Iniciou-se o ensaio com uma percentagem de células mortas de 1,8% e após 10 horas foi a 0,71%.

Verifica-se, portanto, que o desenvolvimento em glicerol apresentou-se muito aquém dos outros ensaios em descontínuo, reflectindo-se também nos parâmetros cinéticos calculados para esse ensaio. O facto do pré-inóculo ter sido realizado num meio onde a fonte de carbono utilizada foi a glucose (**Tabela 1; II**) pode ter sido um dos factores responsáveis pela baixa actividade da *R. glutinis* em meio de glicerol, visto que a maquinaria celular estaria apta para a assimilação de glucose e não de glicerol.

A **Tabela 6** apresenta dados comparativos dos parâmetros cinéticos da cultura em glicerol e da cultura com limitação da fonte de azoto.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos das culturas em biorreactor em glicerol e limitada pelo azoto.

Parâmetros	Glicerol	Limitação de azoto
μ	0,18 h ⁻¹	0,38 h ⁻¹
$Y_{X/C}$	0,2 g·g ⁻¹	0,55 g·g ⁻¹
$Y_{X/N}$	10,3 g·g ⁻¹	26,5 g·g ⁻¹
$Y_{LT/C}$	0,016 g·g ⁻¹	0,105 g·g ⁻¹
$X_{máx}$	0,54 g·L ⁻¹ (10 h)	4,1 g·L ⁻¹ (16 h)
$LT_{máx}$	0,05 g·L ⁻¹ (6 h)	0,86 g·L ⁻¹ (14 h)
$P_{Xmáx}$	0,04 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ (4 h)	0,25 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ (13 h)
$P_{Ltmáx}$	0,008 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ (2 h)	0,061 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ (14 h)

Tanto a taxa específica de crescimento, como a conversão da fonte de carbono em biomassa e em lípidos totais foi muito inferior no ensaio utilizando o glicerol como fonte de carbono. As produtividades volumétricas da biomassa e dos lípidos totais também mostram-se muito inferiores no ensaio utilizando o glicerol quando comparadas com o ensaio utilizando meio formulado para a limitação de azoto.

O fraco desenvolvimento da *R. glutinis* em glicerol também pôde ser observado nos resultados obtidos por Easterling *et al* [10] para o crescimento da *R. glutinis* ATCC 204091 em glicerol em cultura de frascos agitados. Estes autores observaram um aumento de 18% na biomassa após 48 horas de cultura. Neste trabalho, ao final de 10 horas observou-se um aumento da biomassa em 300% em biorreactor. Porém, no trabalho realizado por Easterling, observou-se que o teor de lípidos aumentou em média 13% da 12^a hora até a 48^a hora. Enquanto que neste trabalho, o teor em lípidos totais esteve a cair do início ao término do ensaio.

5.9. Determinação da viabilidade celular através do IP

A determinação da viabilidade celular da população de células de *R. glutinis* durante os ensaios realizados mostrou-se muito condizente com o comportamento esperado para este microorganismo. Um bom exemplo é a resposta às fases de crescimento exponencial onde o rápido aumento do número de células resulta na diminuição da percentagem de células mortas observada no início dos ensaios. Outro exemplo foi na cultura descontínua em meio formulado para a limitação do azoto, a partir do momento em que se esgota a fonte de azoto, a percentagem de células mortas começa a aumentar lentamente, devido à falta desse nutriente. A utilização do IP em células de *R. glutinis* foi utilizada por da Silva *et al* [33] na estirpe *Rhodotomula glutinis* CCMI 145 obtendo-se resultados satisfatórios naquele trabalho.

6. Conclusões

- A correlação entre a fluorescência emitida pelas células coradas com Vermelho do Nilo captada por citometria de fluxo e o teor de lípidos obtido pelo método gravimétrico de Bligh e Dyer associado ao pré-tratamento da biomassa liofilizada com moinho de discos é fiável, replicável e útil para a determinação do teor de lípidos da *R. glutinis* em tempo real por citometria de fluxo no decorrer das fermentações.
- Estudos de optimização do meio para a limitação da fonte de azoto em ensaios descontínuos em biorreactor devem ser realizados com vista no aumento da acumulação de lípidos totais pela *R. glutinis*. O meio formulado neste trabalho possibilitou o esgotamento de outro nutriente essencial à manutenção da levedura algum tempo depois do esgotamento da fonte de azoto. Este facto acabou por limitar a acumulação de lípidos totais pela levedura.
- O crescimento da *R. glutinis* em meio a pH 7 constante apresenta resultados em termos de produtividade lipídica e desenvolvimento da biomassa muito inferiores aos apresentados em pH 5,5.
- A estratégia de aplicação do pulso de carbono com o objectivo de obter uma maior quantidade de biomassa com um maior teor de lípidos totais possui grande potencial de aplicação no desenvolvimento da *R. glutinis*. No entanto, não se pôde obter um resultado satisfatório quando aplicada neste trabalho devido, provavelmente, ao esgotamento de outro nutriente essencial às células além da fonte de azoto.
- O crescimento da *R. glutinis* em meio contendo glicerol, como fonte única de carbono, com vista na produção de lípidos não é economicamente viável.
- A utilização do corante IP associado à citometria de fluxo é um óptimo método para obtenção da percentagem de células mortas, numa população de células de *R. glutinis*, de forma eficaz e em tempo real.

Bibliografia

1. CATALOGUE OF LIFE. Browse taxonomic tree. **Site da Catalogue of Life**. Disponível em: <<http://www.catalogueoflife.org/browse/tree>>. Acesso em: Janeiro 2011.
2. DAI, C.; TAO, J.; XIE, F.; DAI, Y.; ZHAO, M. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2130-2134, 2007.
3. YOON, S. H.; RHEE, J. S. Lipid from yeast fermentation: effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 60, n. 7, p. 1281-1286, 1983.
4. MINIATLAS MIKROORGANISMŮ. Fotografia de colônia de *Rhodotorula glutinis*. **Site da Miniatlas Mikroorganismů**. Disponível em: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/images/kvasinky/kolonie/rhod-gluk.jpg>>. Acesso em: Janeiro 2011.
5. PERRIER, V.; DUBREUCQ, E.; GALZY, P. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. **Arch Microbiol**, v. 164, p. 173-179, 1995.
6. FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA, D.; GRIGOROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and bioengineering**, v. 44, p. 888-894, 1994.
7. BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 41-44, 1999.
8. SQUINA, F. M.; MERCADANTE, A. Z. Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 3, 2003. ISSN 1516-9332.
9. ALVAREZ, R. M.; RODRÍGUEZ, B.; ROMANO, J. M.; DÍAZ, A. O.; GÓMEZ, E.; MIRÓ, D.; NAVARRO, L.; SAURA, G.; GARCÍA, J. L. Lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis* on sugar cane molasses in single-stage continuous culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 214-215, 1992.

10. EASTERLING, E. R.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; LICHA, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 356-361, 2009.
11. LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 80, p. 749-756, 2008.
12. ARES LUSITANI ENERGIAS DO AMBIENTE LDA. Ares Lusitani: O que é biodiesel? **Site da Ares Lusitani Energias do Ambiente Lda**. Disponível em: <<http://www.areslusitani.com/biodiesel/?id=1>>. Acesso em: nov. 2010.
13. RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v. 86, p. 807-815, 2004.
14. MA, Y. L. Microbial oils and its research advance. **Bioprocess Eng**, v. 4, n. 4, p. 7-11, 2006.
15. EDGE, R.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G. The carotenoids as anti-oxidants - a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 41, p. 189-200, 1997.
16. BHOSALE, P.; MOTIWALE L.; INGLE A. D.; GADRE R. V.; RAO K. V. K. Protective effect of *Rhodotorula glutinis* NCIM 3353 on the development of hepatic preneoplastic lesions. **Current Science**, v. 83, p. 303-308, 2002.
17. FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, p. 163-180, 2009.
18. BUZZINI, P. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as sole carbohydrate source. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 41-45, 2000.
19. SABRY, S. A.; GHANEM, K. M.; YUSEF, H. M. Production of microbial lipids from beet molasses. **Journal of Islamic Academy of Sciences**, v. 3:4, p. 310-313, 1990.

20. GHANEM, K. M.; SABRY, S. A.; YUSEF, H. H. Some physiological factors influencing lipid production by *Rhodotorula glutinis* from egyptian beet molasses. **Journal of Islamic Academy of Sciences**, v. 3:4, p. 305-309, 1990.
21. BUZZINI, P. Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis*-*Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 843-847, 2001.
22. GRANGER, L.-M. Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeasts: prediction of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by simple method. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 1151-1156, 1993.
23. RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, 2002.
24. WYNN, J. P.; BEHRENS, P.; SUNDARARAJAN, A.; HANSEN, J.; APT, K. Production of single cell oils by *Dinoflagellates*. In: COHEN, Z.; RATLEDGE, C. **Single cell oils**. 2^a ed., Cap. 6, p. 86-98, 2005.
25. CORTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDENCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M. J.; DA SILVA, M. T.; LEO, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, v. 71, p. 19-33, 2002.
26. HEWITT, C. J.; NEBE-VON-CARON, G. The application of multi-parameter flow cytometry to monitor individual microbial cell physiological state. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 89, p. 197-223, 2004.
27. DA SILVA, T. L.; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J. C. Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim de Biotecnologia**, p. 32-40.
28. DÍAZ, M.; HERRERO, M.; GARCÍA, L. A.; QUIRÓS, C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 385-407, 2010.

29. KIMURA, K.; YAMAOKA, M.; KAMISAKA, Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 331-338, 2004.
30. ALONZO, F. Spectrofluorimetric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red. **Marine Chem**, v. 67, p. 289-301, 1999.
31. DE LA JARA, A.; MENDOZA, H.; MARTEL, A.; MOLINA, C.; NORDSTRÖM, L.; DE LA ROSA, V.; DÍAZ, R. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate *Cryptodinium cohnii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 433-438, 2003.
32. BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, p. 911-917, 1959.
33. DA SILVA, T. L.; FEIJÃO, D.; REIS, A. Using multi-parameter flow cytometry to monitor the yeast *Rhodotorula glutinis* CCMI 145 batch growth and oil production towards biodiesel. **Appl Biochem Biotechnol**, 2010.
34. LEPAGE, G.; ROY, C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. **Journal of Lipid Research**, v. 27, p. 114-119, 1986.
35. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
36. KANEKO, H.; HOSOHARA, M.; TANAKA, M.; ITOH, T. Lipid composition of 30 species of yeast. **Lipids**, v. 11, n. 12, p. 837-844, 1976.

Anexo I - Correlação densidade óptica vs peso seco da biomassa

Foi realizada a correlação entre a densidade óptica a 600 nm e o peso seco da biomassa (**Figura 14**) de forma a ser utilizada nas culturas de *R. glutinis* com o intuito de obter-se a concentração de biomassa ao longo do tempo de modo simplificado e fiável.

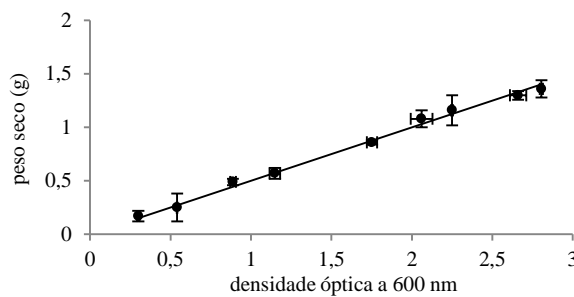


Figura 14. Gráfico da correlação entre a densidade óptica a 600 nm e o peso seco da *R. glutinis*.

Esta curva é constituída por nove pontos, sua recta de tendência passa pelo ponto zero em ambos os eixos, apresenta um R^2 de 0,9941 e é representada pela equação $y = 0,4995x$.

Anexo II - Normas para a produção de biodiesel

Biodiesel Standards		EUROPE	GERMANY	USA	PETROLEUM DIESEL
Specification		EN 14214:2003	DIN V 51606	ASTM D 6751-07b	EN 590:1999
Applies to		FAME	FAME	FAAE	Diesel
Density 15°C	g/cm ³	0.86-0.90	0.875-0.90		0.82-0.845
Viscosity 40°C	mm ² /s	3.5-5.0	3.5-5.0	1.9-6.0	2.0-4.5
Distillation	% @ °C			90%,360°C	85%,350°C - 95%,360°C
Flashpoint	°C	120 min	110 min	93 min	55 min
CFPP	°C	* country specific	summer 0 spr/aut -10 winter -20		* country specific
Cloud point	°C			* report	
Sulphur	mg/kg	10 max	10 max	15 max	350 max
CCR 100%	%mass		0.05 max	0.05 max	
Carbon residue (10%dist.residue)	%mass	0.3 max	0.3 max		0.3 max
Sulphated ash	%mass	0.02 max	0.03 max	0.02 max	
Oxid ash	%mass				0.1 max
Water	mg/kg	500 max	300 max	500 max	200 max
Total contamination	mg/kg	24 max	20 max		24 max
Cu corrosion max	3h/50°C	1	1	3	1
Oxidation stability	hrs;110°C	6 hours min		3 hours min	N/A (25 g/m3)
Cetane number		51 min	49 min	47 min	51 min
Acid value	mgKOH /g	0.5 max	0.5 max	0.5 max	
Methanol	%mass	0.20 max	0.3 max	0.2 max or Fp <130°C	
Ester content	%mass	96.5 min			
Monoglyceride	%mass	0.8 max	0.8 max		
Diglyceride	%mass	0.2 max	0.4 max		
Triglyceride	%mass	0.2 max	0.4 max		
Free glycerol	%mass	0.02 max	0.02 max	0.02 max	
Total glycerol	%mass	0.25 max	0.25 max	0.24 max	
Iodine value		120 max	115 max		
Linolenic acid ME	%mass	12 max			
C(x:4) & greater unsaturated esters	%mass	1 max			
Phosphorus	mg/kg	10 max	10 max	10 max	
Alkalinity	mg/kg		5 max		
Gp I metals (Na,K)	mg/kg	5 max		5 max	
GpII metals (Ca,Mg)	mg/kg	5 max		5 max	
PAHs	%mass				11 max
Lubricity / wear	µm at 60°C				460 max